

ZUR IDENTITÄTSPRÜFUNG UND
WERTBESTIMMUNG DER CYNARA-,
OLEA- UND PETASITES - DROGEN

Gertrud Huber
Pfarrkirchen

Juni 1975

1976

ZUR IDENTITÄTSPRÜFUNG UND WERTBESTIMMUNG DER CYNARA-,
OLEA- UND PETASITES-DROGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Gertrud Huber
aus
Pfarrkirchen

Juni 1975



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1976

A MADAME JACQUES DEBELMAS

Agrégée de Pharmacognosie
Professeur à l'U.E.R. des
Sciences pharmaceutiques et
biologiques de l'Université
scientifique et médicale
de Grenoble

En témoignage de ma profonde reconnaissance

A mes amis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0090

Herrn Professor Dr.Hildebert Wagner danke ich für das Thema, seine Betreuung, Anregung und Kritik, die dem Fortgang der Arbeit dienlich waren.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Professor Dr.phil.habil. Dr.med.h.c. Ludwig Hörhammer, der in mir die Liebe zur "Scientia amabilis" weckte und während der Jahre meiner Promotion allen meinen Problemen aufgeschlossen gegenübergestanden ist. Ihm verdanke ich nicht zuletzt das wertvolle Jahr meines Auslandsstudiums mit seinen wissenschaftlichen und freundschaftlichen Kontakten.

Schließlich geht mein Dank auch an meine Laborkollegen, voraus an Dr.Heinrich Glasl für seine Anregungen, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in der Gaschromatographie.

In freundschaftlichem Klima und permanentem wissenschaftlichen Austausch habe ich mit Dr.V.M.Chari, Dr.Paul Diesel, Dr.Günther Demuth, Dr.Peter Kazmair, Dr.Ruth Riessner, Dr.Roland Schaette und Dr.Lothar Sprinkmeyer zusammengearbeitet, ohne Dr.Andras Liptak, Debrecen, zu vergessen, der mir während seines einjährigen Aufenthaltes in unserem Labor sehr wertvolle Anregungen und Ratschläge erteilte.

E I N L E I T U N G

Der Drogenhandel führt eine Reihe von Drogen mit ihren verschiedenen Zubereitungen, für die es noch keine oder z.T. nur ungenügende Identitäts- und Reinheitsprüfungen gibt. Dasselbe gilt für die eigentlichen Wertbestimmungsverfahren. Ursache hierfür ist in den meisten Fällen das Fehlen genauer Kenntnisse über die eigentlichen Wirkprinzipien und ihre Chemie. In dem Maße, als diese zur Verfügung stehen, stellt sich die Forderung nach Ausarbeitung solcher Verfahren.

In der Liste der pharmazeutisch wieder interessant gewordenen Drogen, für die in den letzten Jahren die Wirkprinzipien chemisch aufgeklärt wurden, stehen die *A r t i s c h o c k e* (*Cynara scolymus*), die *P e s t w u r z* (*Petasites hybridus*) und die *O l i v e* (*Olea europaea*) an erster Stelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Lücke mit Hilfe der heute zur Verfügung stehenden analytischen Methoden zu schließen und die Voraussetzungen für eine Standardisierung dieser Drogen bzw. ihrer Zubereitungen zu schaffen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
<u>CYNARA SCOLYMUS L.</u>	
A. EINLEITUNG	1
I. Arzneiliche Verwendung der Artischocke, Cynara scolymus L., in der Geschichte und modernen Therapie	1
II. Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Artischocke	5
B. ZUR ANALYTIK DER ARTISCHOCKENINHALTSSTOFFE	10
I. Bisherige Analysenmethoden	10
II. Eigene Methoden der Wirkstoffanalyse und Wertbestimmung	14
1. Identitätsprüfung von Folia Cynarae durch Chromatographie und Nachweis der Phenolcarbonsäuren und Flavonoide	14
2. Quantitative Bestimmung des Cynarins in Folia Cynarae und deren Zubereitung	18
C. ÜBER DIE STABILISIERUNG DER DROGE FOLIA CYNARAE UND IHRER ZUBEREITUNGEN	30
I. Bisherige Untersuchungen	30
II. Eigene Untersuchungen	32
<u>OLEA EUROPAEA L.</u>	
A. EINLEITUNG	36
I. Arzneiliche Verwendung der Ölbaumblätter	36
II. Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Olivenblätter und ihre pharmakologische Wirkung	37
B. ZUR ANALYTIK DER INHALTSSTOFFE	41
I. Bisherige Analysenmethoden	41
II. Eigene Methode der Wirkstoffanalyse und Wertbestimmung	41
1. Identitätsprüfung eines Olivenblätterrauszuges	41
2. Quantitative Bestimmung des Oleuropeins in Olivenblatt-Extrakten	47
3. Wertbestimmung des Oleuropeins in der Droge und ihren Zubereitungen	53
C. STABILISIERUNG DER ÖLBAUMLÄTTERDROGE UND IHRER ZUBEREITUNGEN	56

PETASITES MILL. UND TUSSILAGO FARFARA L.

A. EINLEITUNG	59
I. Arzneiliche Verwendung von Petasites-Arten . .	59
II. Mikroskopische Identitäts- und Reinheitsprüfung	59
III. Die in Europa vorkommenden Petasites-Arten . .	60
IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Petasites	
Mill.	63
B. ZUR ANALYTIK DER INHALTSSTOFFE	67
I. Bisherige Analysenmethoden	67
II. Eigene Untersuchungen	68
1. Verwendetes Drogenmaterial	68
2. Chromatographische Identitätsprüfung von	
Petasites-Arten und Tussilago farfara	69
3. Quantitative Wertbestimmung der Petasites-	
Droge über die Bestimmung der "Petasine" . .	82
4. Quantitative gaschromatographische Bestimmung	86
5. Untersuchung der "S-Petasine"	89
ZUSAMMENFASSUNG	90a
EXPERIMENTELLER TEIL	91
A. DROGENHERKUNFT	91
B. ZU DEN UNTERSUCHUNGEN VERWENDETE GALENISCHE ZUBE-	
REITUNGEN	92
C. HERSTELLUNG DER EXTRAKTE	93
D. HERKUNFT DER VERGLEICHSSUBSTANZEN	94
E. ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	95
F. DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNGEN - <u>FOLIA CYNARAE</u> . .	99
I. Identifizierung der Phenolcarbonsäuren und Poly-	
oxyflavone	99
II. Quantitative Bestimmung des Cynarins	100
<u>FOLIA OLEAE</u>	103
I. Identitätsnachweis über das Oleuropein bzw.	
dessen Abbauprodukt	103

	Seite
II. Charakterisierung der flavonoiden Inhaltsstoffe .	104
III. Identifizierung des Dihydroxyphenyläthylalkohols .	104
IV. Identifizierung des Rutins	105
V. Quantitative Bestimmung des Oleuropeins	105
1. Vorbereitung der Droge oder galenischen Zubereitung	105
2. Bestimmung des Oleuropeins mit der Anthron-Methode	106

FOLIA PETASITES

I. Identifizierung eines Petasites-Auszuges	110
II. Schleimgehaltsbestimmung	111
III. Quantitat. Bestimmung der "Petasine"	112
1. Photometrische Absorptionsmessung	112
2. Gaschromatographische Bestimmung	114
3. Untersuchung der "S-Petasine".	115
G. STABILITÄTSVERSUCHE	116
LITERATURVERZEICHNIS	117

CYNARA SCOLYMUS

A. EINLEITUNG

I. Arzneiliche Verwendung der Artischocke, *Cynara scolymus* L., in der Geschichte und modernen Therapie

Die Verwendung der Artischocke, *Cynara scolymus* L., als Gemüse- und Heilpflanze kann auf eine zweitausendjährige Geschichte zurückblicken. Bereits im frühesten Altertum arzneilich verwendet, hat sie sich bis heute in der Therapie behauptet. Außer im Homoeopathischen Arzneibuch werden die *Folia Cynarae* in den Monographien der Brasilianischen, Rumänischen und Französischen Pharmakopoe beschrieben.

Cynara scolymus L., die Artischocke, ist eine perennierende, taxonomisch in der Familie der Asteraceae (Körbchenblütler) im Tribus Cynarae eingeordnete Distel (Cardinae). Im ersten Jahr bildet sie nur eine kräftige, bis 60 cm hoch werdende Rosette aus meist fiederteiligen und nur wenig bestachelten Blättern, die einen Durchmesser von 1 m erreichen kann. Im zweiten Jahr wird der Blütenstand getrieben, der etwa 70 cm, bei Einzelexemplaren sogar bis 2 m hoch werden kann. Die Pseudanthien mit blauviolettten Blüten erreichen einen Durchmesser von 12 bis zu 15 cm. Die noch geschlossenen Pseudanthien werden als Artischocken bezeichnet, deren Blütenstandsboden mit den unteren fleischigen Teilen der schuppigen Hüllkelchblätter als wertvolles Gemüse gelten. Von der Kardone oder spanischen Artischocke, *Cynara cardunculus* L., die im Habitus vor allem kleiner und stärker bestachelt ist, werden dagegen die gebleichten Blattstiele und Mittelrippen als Gemüse verwendet. Die grünen Blätter beider *Cynara*-Arten liefern die Droge *Folia Cynarae*. Da aber lediglich *Cynara scolymus* kultiviert wird, sind auch nur die Blätter dieser Art im Drogenhandel vorzufinden. In früheren Zeiten wurden gelegentlich auch die Wurzeln gebraucht.

Ursprünglich äthiopischer Herkunft, gewann sie, wie viele andere Nahrungsmittel, nach und nach den ganzen Mittelmeerraum. Ihre exakte Abstammung aber bleibt problematisch: ROCHIETTA¹⁾ vertritt die Meinung, daß es sich bei ihr nicht um eine ursprüngliche Varietät handelt, sondern um das Ergebnis einer Entwicklung aus einer wuchernd und wildwachsenden Urform, *Cynara cardunculus* L., Kardone oder auch spanische Artischocke genannt. Auf diese Art dürften sich auch Abbildungen und Beschreibungen beziehen, die man vor die Zeitenwende datiert und bei denen es sich nach MAYR und FRÖHLICH²⁾ um einen Irrtum geschichtlicher Forschung handelt.

Während des Mittelalters ging der Gebrauch der Artischocke verloren und sie erschien erst wieder im 15. Jahrhundert in Italien. Vom 16. Jahrhundert an wird die Kenntnis von der arzneilichen Verwendung der Artischockenblätter durch die weite Verbreitung der Kräuterbücher in Europa allgemein und man kann eine steigende Anwendung dieser Pflanze beobachten (Hironymus Bock "Welsch Distel"). 1761 verordnete Pierre Jean Baptiste CHOMEL³⁾ einen Blattdekokt gegen Ikterus und Hydrops und bestätigte somit die beiden bereits von GALEN vermuteten therapeutischen Eigenschaften der Artischocke.

Im 19. Jahrhundert macht sich die Volksmedizin die seit GALEN bekannte hepatorenale Wirkung zu Nutze, indem sie Blattinfuse, Wurzeldekotte oder den frischen Pflanzensaft zur Behandlung von Leberkrankheiten mit erschwerter Gallensekretion heranzieht. Zu dieser Zeit begannen auch die ersten chemischen Untersuchungen der Pflanze. GUITTEAU⁴⁾ gewann aus ihr einen wässrig-alkoholischen, sehr bitteren, dem Aloe-Extrakt sehr ähnlichen Auszug. Da man bei diesem Auszug auch einen positiven Ausfall der Bornträgerreaktion zu beobachten glaubte, betrachtete man die Artischocke lange Zeit als eine Droge mit laxierenden Verbindungen vom Anthrachinontyp.

Der Versuch, die medizinische Wirksamkeit exakt zu begründen, begann aber erst im 20. Jahrhundert durch den französischen Arzt und Forscher BREL⁵⁾, der 1926 bahnbrechende tierexperimentelle und klinische Versuche durchführte. Er stellte bei Gelbsucht-Fällen eine schnelle Entfärbung der Haut sowie auch das frühe Verschwinden der Gallenfarbstoffe aus dem Urin fest, wobei er auch die bemerkenswerte diuretische Wirkung des *Cynara scolymus*-Extraktes betonte. An erster Stelle aller klinischen Untersuchungen steht die choleretische Wirkung, die anfangs der dreißiger Jahre besonders von CHABROL, CHARONNAT, MAXIMIN und WAITZ⁶⁾, später von SCHINDEL⁷⁾ beschrieben wurde. BÖHM⁸⁾ konnte sie bei den von ihm untersuchten Extrakten bestätigen.

Die genaue Begründung dieser bekannten Wirksamkeit erfolgte aber erst 1954, nachdem es PANIZZI und SCARPATI⁹⁾ gelungen war, das Wirkprinzip, das Cynarin, zu isolieren. Das Cynarin zeigte eine beachtliche Leberwirksamkeit und dürfte für die choleretische Wirkung der Artischocke verantwortlich sein.

So beobachtete OKAMOTO¹⁰⁾ eine auffallende Steigerung der Ausscheidung von Galle. Andere Autoren^{11,12)} weisen darauf hin, daß bei gesunden Personen und Patienten mit Leber- und Galleerkrankungen die Anregung der Gallensekretion sehr beachtlich ist. BERTOLANI¹³⁾ und Mitarb. verabreichten daher das Cynarin gleichzeitig mit dem Röntgen-Kontrastmittel, um ein klares Bild der intra- und extrahepatischen Gallenwege zu erhalten. HAMMERL und PICHLER¹⁴⁾ stellten fest, daß der Artischockenextrakt neben der genannten verstärkten Sekretion von Galle auch eine solche von Fermenten des Pankreas bewirkt. Von SCHREIBER und Mitarb.¹⁵⁾ wurde eine cholagoge Wirkung festgestellt. Nach Verabreichung von Cynarin beobachteten sie eine verstärkte fäkale Ausscheidung von Gallensäuren. TIXIER und Mitarb.¹⁶⁾ geben an, daß die Fähigkeit der Leber, Harnstoff zu synthetisieren, durch Cynara verstärkt und gleichzeitig die Ausscheidung dieses metabolischen Produktes durch die Nierenfilter stimuliert wird. Mit dem Wirkstoff Cynarin stellten PREZIOSI und LOSCALCO¹⁷⁾ an Ratten eine gute diuretische Wirkung fest. Nach GAUDIN¹⁸⁾ schützt Cynara die Leber auch gegen schädigende Einwirkung einiger toxischer Substanzen. Dieser direkte Wirkungsangriff an der Leber bewog ihn und später OUDOT¹⁹⁾ diesen Stoff vorbeugend gegen Leberschädigungen zu empfehlen.

In den neuesten Arbeiten stellten MAROS und Mitarb.²⁰⁾ an Ratten fest, daß Gaben eines wässrigen Blattextraktes die Gewichtszunahme der Leber beschleunigt, eine ausgeprägte hyperaemisierende Wirkung ausübt, die Energiereserven der Leber mobilisiert und gleichzeitig eine bedeutende Steigerung der doppelkernigen Hepatozyten und des RNS-Gehaltes der Leberzellen hervorruft. Da sich diese Wirkungen nach Verabreichung des Wurzelextraktes nur in geringerem Maße feststellen lassen, vermutete man, daß die hepatostimulierenden Prinzipien der Cynara scolymus nur in den Blättern konzentriert sind.

TIXIER und ECK²¹⁾ verwendeten bereits 1934 Artischockenzubereitungen zur Behandlung der Hypercholesterinaemie. TIXIER und GODREAU²²⁾ bestätigten diese Wirkung experimentell und klinisch und DEL VECCHIO²³⁾, PREZIOSI und LOSCALCO¹⁷⁾ sind der Meinung, daß dieser Effekt auf eine Anregung der Synthese der Cofermente DPN und TPN durch das Cynarin zurückzuführen sind, also auf eine Mobilisierung der hepatischen Funktionen, die für die Regelung des intermediären Stoffwechsels der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße verantwortlich sind. Durch die Senkung des Gesamtcholesterinspiegels und des Cholesterinanteils in den β -Lipoproteiden des Serums kann eine günstige Wirkung des Cynarins bei Arteriosklerose abgeleitet werden²⁴⁾.

Obwohl alle Autoren eindeutig dem Cynarin die cholagogen und choleretischen Eigenschaften zusprachen, blieb lange Zeit die Frage offen, ob diese Substanz allein oder zusammen mit den Flavonoiden für die diuretische Wirkung verant-

wortlich sei. Die Tatsache, daß einige Extrakte, wie z.B. der unter dem Namen Chophytol im Handel befindliche gereinigte Extrakt von *Cynara scolymus*, deutliche Aktivität bei chronischer Nephritis, cardialer und cirrhotischer Oligurie aufwiesen, obwohl sie weder Cynarin noch Flavonoide enthalten, veranlaßte in den letzten Jahren zwei französische Forscherteams nach einem weiteren Wirkprinzip in den Artischockeblättern zu suchen. Sie interessierten sich vor allem für das bittere Prinzip, insbesondere für die im Cynaropicrin verestert vorliegende α -Hydroxymethylacrylsäure, die große hepatorenale Aktivität aufweist. Ihre pharmakologischen Untersuchungen ergaben auch, daß die in der Artischocke vorhandenen Hydroxyfettsäuren Malon-, Bernstein- und Zitronensäure die hepatische und diuretische Wirkung vermehren und daß die Gabe aller 4 Säuren die größte Wirkung ergibt. Sie bestätigen, daß der choleretische Effekt allein dem Cynarin zukommt; dieser wird aber durch den Synergismus der genannten 4 Säuren verstärkt, ebenso wie umgekehrt diese Säuren durch das Cynarin und die anderen Polyphenole in ihrer Wirkung potenziert werden.

Die tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen zeigen, daß der Artischocke mehrere Wirkungen zukommen:

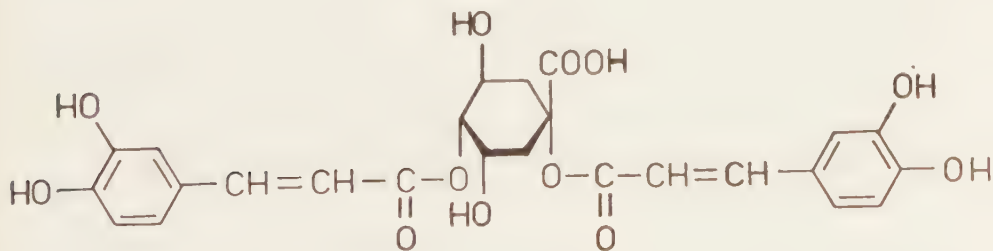
1. Stimulierung der Cholerease und Schutzwirkung gegenüber den Lebergiften
2. Senkung von erhöhtem Blutcholesterinspiegel
3. Förderung der Diurese
4. Senkung der Serum-Lipide (freie Fettsäuren, Glycerin, Triglyceride und β -Lipoproteide).

*) 27) a. und b.

II. Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Artischocke

1840 isolierte GUITTEAU⁴⁾ aus den grünen Blättern der Artischocke einen Stoff, den er Cynarin nannte und den er für ein dem Aloin ähnliches Oxyanthrachinonglucosid hielt. Noch MORELLET²⁵⁾ war 1930 derselben Meinung. Diese wurde von CHABROL und Mitarb.⁶⁾ durch den negativen Ausfall der Bornträgerreaktion widerlegt. 1952 isolierte BALANSARD²⁶⁾ aus *Cynara scolymus* die organischen Säuren Malon-, Milch-, Glykol- und Glycerinsäure, MORTIER²⁷⁾ a) hoch zusätzlich Zitronen- und Bernsteinsäure.

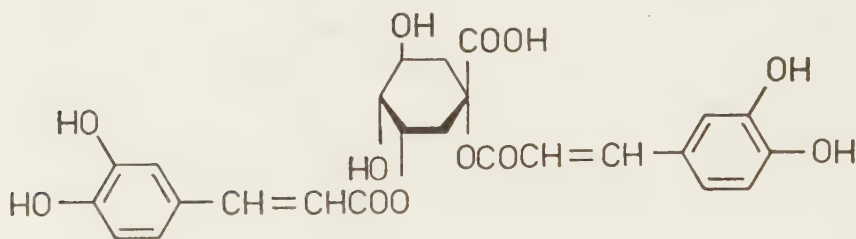
ROSA²⁸⁾ erhielt bei seinen Isolierungsarbeiten eine kristalline Verbindung, in der er ein "polycyclisches Phenol" vermutete. In den Handel gelangte dieses Produkt unter dem Namen "Chophytol". PANIZZI und SCARPATI^{9a/b)} schließlich gelang, basierend auf den Arbeiten von CHABROL⁶⁾, RAVINA²⁹⁾, TIXIER und DE SEZE^{30,31)} die Strukturaufklärung dieser Verbindung. Sie nannten sie Cynarin und identifizierten sie als 1,4-Dicaffeoylchinasäure. Die Bestätigung der Struktur gelang ihnen durch die Synthese.



Cynarin (PANIZZI 1954)
1,4-Dicaffeoylchinasäure

Später stellten die beiden Autoren³²⁾ aber fest, daß dieser Verbindung in Wirklichkeit die Struktur 1,5-Dicaffeoylchinasäure

säure zukommt. Genuin liegt dieses Cynarin als 1,3-Dicaffeoylchinasäure in der Pflanze vor. Während der Extraktion erfolgt eine Isomerisierung zur 1,5-Dicaffeoylchinasäure.

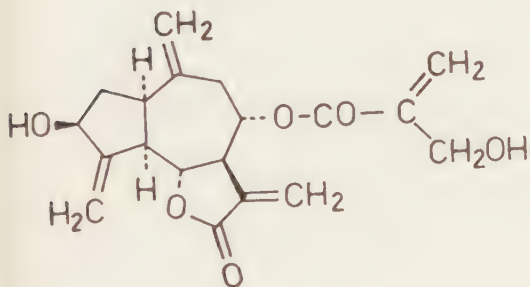


Cynarin (PANIZZI 1965)
1,5-Dicaffeoylchinasäure

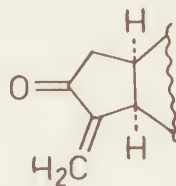
An weiteren Phenolcarbonsäuren isolierten SCARPATI und Mitarb.³³⁾ Kaffee- und Chlorogensäure (3-Caffeoylchinasäure) und in den darauffolgenden Jahren³⁴⁾ Neochlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) und die isomere 4-Caffeoylchinasäure. DRANIK³⁵⁾ wies die 1-Caffeoylchinasäure nach. NICHIFORESCU³⁶⁾ nennt wie MICHAUD³⁷⁾ die 1,3-Dicaffeoylchinasäure und die 3,5-Dicaffeoylchinasäure, die nach SCARPATI und GUIO³⁸⁾ zusammen mit der 3,4- und 4,5-Dicaffeoylchinasäure die "Isochlorogensäure" bildet.

Die zweite große Gruppe der Inhaltsstoffe der Artischockenblätter bilden die Polyoxyflavone, die nach NICHIFORESCU³⁹⁾ in biosynthetischer Beziehung zu den Phenolcarbonsäuren stehen. MASQUELIER und MICHAUD^{40,41,42)} isolierten an flavonoiden Verbindungen aus Blatt und Blüte Cynarosid, ein Luteolin-7-O-glucosid⁴⁰⁾ und Scolymosid, ein Luteolin-7-O-rutinosid⁴¹⁻⁴³⁾, während DRANIK und CHERNOBAI⁴⁴⁾ das Cynarotriosid, ein Luteolin-7-O-rutinosyl-4'-O-glucosid fanden.

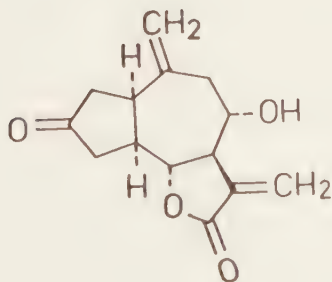
1960 isolierte man die ersten Bitterstoffe, die die Verwendung der Blätter als Amarum begründen. Bisher sind drei dieser Sekundärstoffe gefunden und in ihrer Struktur aufgeklärt worden: Cynaropicrin, Dehydrocynaropicrin und Grosheimin⁴⁵⁾. Diese Verbindungen gehören der Gruppe der Sesquiterpenlactone an. Sie bilden Ester eines Guajanolids mit der α -Hydroxymethylacrylsäure. Die Grundkörper von Cynaropicrin und Grosheimin stellen tautomere Formen dar.



Cynaropicrin



Dehydrocynaropicrin



Grosheimin

Das Vorkommen von Dehydrocynaropicrin und Grosheimin scheint im Gegensatz zu Cynaropicrin rassen- oder auch standortabhängig zu sein, denn SAMEK und Mitarb.⁴⁶⁾ fanden, daß das Cynaropicrin in Blättern italienischer Herkunft von Grosheimin, in polnischer Droge aber von Dehydrocynaropicrin begleitet wird. Wenn man die Blätter einer Fermentation von 6 Tagen unterwirft, findet man nur noch ein Guajanolid, das GONZALES und Mitarb.⁴⁷⁾ als Isoamberboin identifizierten.

Ein weiteres Sesquiterpenlacton, das Cynarolid, isolierte DROZDZ⁴⁸⁾.

MORTIER^{27)a.} vermutet, daß die im Cynaropicrin veresterte α -Hydroxymethacrylsäure auch frei in der Pflanze vorkommt.

Als weitere Sekundärstoffe werden von ATHERINOS⁴⁹⁾ Taraxasterol, Pseudoteraxasterol, Stigmasterin, β -Sitosterin und ein neues Trihydroxysapogenin, Cynarogenin, angegeben.

BERNHARD und LALLEMAND⁵⁰⁾ erwähnen die Anwesenheit von Schleim, Pektin, Tannin und Zuckern in den Artischockenblättern.

Der hohe Gehalt an Enzymen, wie Cynarase, Ascorbinase, Katalasen, Oxidasen und Peroxidasen bedingt die starke Qualitätsminderung der Droge bei der Lagerung.

In nachfolgender Tabelle wird eine Übersicht über die heute bekannten Inhaltsstoffe der Artischocke gegeben.

T a b e l l e 1

Chemische Zusammensetzung der Artischocke

Polyphenole		Bitterstoffe	Steroide	org. Hydroxy- säuren	Zucker	Tannin
Phenolcarbon- säuren	Flavonoide					
Cynarin ^{39a/b)} ³⁷⁾	Cynarosid	Cynaropicrin	Taraxasterol	Malonsäure	Glucose	
Kaffeesäure ³³⁾	Scolymosid	Dehydrocynaro- picrin	Pseudotara- xasterol	Glykolsäure	Lävulose	Catechin- gerbstoff
Chlorogensäure ³³⁾				Glycerinsäure	Inulin	
(3-Caffeoyl- chinasäure)	Cynarotriosid					
Neochlorogensäure ³⁴⁾		Grosheimin	Stigmasterin	Milchsäure		
(5-Caffeoylchina- säure)						
Cryptochlorogen- säure ³⁴⁾						
(4-Caffeoylchina- säure)		Cynarolid	β-Sitosterin	Zitronensäure		
Pseudochlorogen- säure ³⁵⁾						
(1-Caffeoylchina- säure)			Cynarogenin	Bernsteinsäure		
Isochlorogensäure ³⁶⁾						
(4,5-Dicaffeoylchinasäure)						
(3,4-Dicaffeoylchinasäure)						
(3,5-Dicaffeoylchinasäure)						
						α-Hydroxy- methacrylsäure

ZUR ANALYTIK DER ARTISCHOCKENINHALTSSTOFFE

I. Bisherige Analysenmethoden

Mit der Analytik der Polyphenole aus *Folia Cynarae* beschäftigten sich in den letzten 15 Jahren mehrere Arbeitskreise.

Bereits SCARPATI und Mitarb.³⁵⁾ chromatographierten die Phenolcarbonsäuren auf Whatman-Papier Nr. 1 in 0.1 n HCl oder Butanol-Äthylacetat-Wasser (63:10:27) und besprühten mit 3-5%iger FeCl_3 -Lösung. Sie geben an, daß in 0.1 n HCl Cynarin genügend weit von der Kaffee- und der Chlorogensäure abgetrennt sei, um eine approximative Bestimmung durchführen zu können.

Eine Identitätsprüfung für Artischockenblätter wird auch im Codex français 1965 vorgeschrieben. Man verwendet für die Papierchromatographie das Laufmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Die auf dem getrockneten PC unter dem UV-Licht bläulich fluoreszierenden Flecke werden durch Besprühen mit 5%iger alkohol.KOH oder 2%iger alkoholischer FeCl_3 -Lösung sichtbar gemacht. Der CF 65 nennt einen Fleck bei R_f 0.58, der mit Cynarin identisch ist und einen weiteren bei R_f 0.8, der mit Kaffeesäure identisch sein soll.

Neben der qualitativen Analyse der Phenolcarbonsäuren wurden seit 1958 auch einige Versuche zu ihrer quantitativen Bestimmung unternommen. Diese basierten auf dem kurzwelligen Absorptionsmaximum (325 nm) des Cynarins. SAMOCHO⁵¹⁾ bestimmte das Cynarin spektrophotometrisch in Blättern und Wurzeln von *C. scolymus* und *C. cardunculus* polnischer Herkunft. CALZOLARI und DONDA⁵²⁾ a.u.b. stellten fest, daß Chlorogensäure (a), Kaffeesäure (a) und Cynarin (b) bei pH 7.5 - 9.5 ein etwas unterschiedliches UV-Spektrum aufweisen und sie führten spektrophotometrische Einzelbestimmungen für die Reinsubstanzen durch. Sie ermittelten Cynarin mit einem relativen Fehler von $\pm 1\%$ und Kaffee- und Chlorogensäure mit einem relativen Fehler von $\pm 2.5\%$.

In den folgenden Jahren wurden die Fließmittel, Adsorptionen und Elutionsmittel variiert (siehe Tabelle 2, S. 12).

Von den Farbreaktionen wurde am häufigsten die Nitrierungsreaktion mit Arnow-Reagens⁵⁸⁾ angewendet. LONGO⁵⁹⁾ bestimmte hiermit bei 505 nm das Cynarin in pharmazeutischen Zubereitungen. In Tabelle 3, S. 13, sind die Arbeiten zusammengefaßt, die auf einer Cynarinbestimmung mittels Farbreaktion beruhen.

Methoden zur Bestimmung von Cynarin in Serum und Harn, welche für die pharmakologischen Untersuchungen von Bedeutung sind, haben FRÖHLICH⁵⁷⁾ in Vorschlag gebracht (siehe auch Tab. 2, S. 12).

Für den Artischockenbitterstoff Cynaropicrin stellten SCHNEIDER und THIELE⁶⁷⁾ eine qualitative und quantitative Bestimmungsmethode auf. Nachdem nunmehr die pharmakologischen Wirkprinzipien der Artischocke weitgehend bekannt und chemisch definiert sind, sind die Voraussetzungen für exaktere Reinheits-, Identitäts- und Wertbestimmungsverfahren der Droge und daraus hergestellter Zubereitungen gegeben.

Zur chromatographischen Identitäts- und Reinheitsprüfung eignen sich die phenolischen Verbindungen in ihrer Gesamtheit. Da das Cynarin als Hauptwirkstoff der Droge gelten kann, muß die Qualitätsbeurteilung und Wertbestimmung die quantitative Bestimmung des Cynarins zum Ziele haben. Auch die verschiedenen Präparate, die in letzter Zeit auf dem Arzneimittelmarkt erschienen sind, enthalten auf Cynarin eingestellte Artischockenextrakte und machen daher eine exakte Bestimmung dieses Wirkstoffes notwendig.

T a b e l l e 2

Autor	Adsorbens	Laufmittel	Detektion	Bestimmungsmethode
GHIELMETTI und BACCHINI 53)	PC Whatman-Papier Nr. 1	Methanol-Benzol-Iso- amylalkohol-Wasser (40:20:20:20) 24 Stdn. bei Kammer- sättigung	ammoniakal. Silbernitratlösung	UV-Spektrum
DRANIK 54)	PC	0.1 n HCl		nach Elution mit 50%igem Methanol UV-Spektrum
COLOMBO 55)	Kieselgel mit NaHCO ₃ gepuffert	Äthylacetat-Eis- essig-Methanol (85:10:5)	2%ige ammoniakal. Silbernitratlösung	UV-Spektrum
SCHILCHER 56)	Cellulose	2%ige Essigsäure + Pyridin (3%) oder 15%ige Essigsäure		nach Elution mit Methanol oder Pyridin UV-Spektrum oder direkte Remissions- messung
FRÖHLICH 57) (im Serum)	1. MN CEL 300 UV 254 (Vorreinigung durch DC mit MeOH) 2. MN SIL G UV	Eisessig-Pyridin- Methanol-Wasser (2:3:20:75) Äthylacetat-Methanol- Wasser (100:16.5:13.5)	10%ige meth.KOH	nach Elution mit 50%igem Äthanol UV-Spektrum

T a b e l l e 3

Autor	Auftrennung	Farbreaktionen
MICHAUD 60)	PC	Arnou-Reagens
NICHIFORESCU u. Mitarb. 61)		Arnou-Reagens
RODRIGUEZ 62)		Arnou-Reagens
SCENAMA u. GARDE 63)	DC nach COLOMBO 55)	Arnou-Reagens
MICHAUD 64)	PC absteigend (Arches 304) in 0.1% n NCl	direkte densitometrische Auswertung des Farbkomplexes von Cyanoferrat
CONSTANTINESCU u. Mitarb. 65, 66)	PC auf Schleicher u. Schüll 2043 B im Laufmittel: <u>Phenolcarbons:</u> Isoamylalkohol-Wasser-Eisessig (40:10:10) und n-Butanol-Eisessig-Wasser (63:10:27) Detektion: FeCl ₃ und AgNO ₃ <u>Polyhydroxyflavone:</u> Salzsäure-Eisessig-Wasser (63:15:82) = Forestalllösung Detektion: AlCl ₃	photometrische Gesamtphenolbestimmung mit Phosphorwolframsäure-Reagens nach FOLIN Gehalt an Phenolcarbonsäuren durch Differenzbestimmung des Polyhydroxyflavongehaltes (s.u.)
		Farbreaktion mit Al-III -chlorid Gehaltsberechnung mit Hilfe der Eichgeraden des Rutins

II. Eigene Methoden der Wirkstoffanalyse und Wertbestimmung

1. Identitätsprüfung von Folia Cynarae durch Chromatographie und Nachweis der Phenolcarbonsäuren und Flavonoide

Wir verwendeten Kieselgel-Platten mit Fluoreszenzindikator und benutzten das für Flavonoide mehrmals schon erprobte Fließmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3), wobei wir die Konzentration des Äthylacetatanteiles von 10 auf 20 Teile erhöhten. Die Auswertung erfolgte zunächst im kurzwelligen UV-Licht bei 254 nm. Dabei liefern Cynarin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Isochlorogensäure eine Fluoreszenzminderung. Anschließend wurden die Chromatogramme im langwelligen UV-Licht von 366 nm betrachtet. Hier zeigen die einzelnen Phenolcarbonsäuren typische blaue Fluoreszenzfarben, die nach Bedampfen mit konzentriertem Ammoniak und sofortigem Betrachten im langwelligen UV-Licht in Grün übergehen (s. Abb. 1, S. 16). Zur Sichtbarmachung im Tageslicht verwendeten wir die Sprühreagentien 2%ige alkohol.Fe-III-Cl-Lösung und 5%ige alkohol.Kalilauge. Die verschiedenen Fluoreszenzfarben sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

T a b e l l e 4

	UV 366 nm		Tageslicht	
	unbesprüht	bed. mit NH_3	FeCl_3	KOH
Cynarin R_f 0.5	dunkelblau (schwer sichtbar)	grau-grün	blaugrünlich	gelb
Chlorogensäure R_f 0.34	türkisblaue Fluoreszenz	gelb-grün	blaugrünlich	gelb
Kaffeesäure R_f 0.91	fahle hellblaue Fluoreszenz	fahlgrünlich	blaugrünlich	-

Bei Reihenuntersuchungen von Drogenmustern und Präparaten des Handels stellten wir fest, daß lediglich Frischpflanzenauszüge Cynarin enthielten. In Auszügen aus getrockneten Blättern, in Trockenextrakten oder Arzneispezialitäten, die Trockenextrakte von Folia Cynarae enthielten, war weder im kurzwelligen noch im langwelligen UV-Licht vor und nach Behandlung mit Sprühreagentien Cynarin nachweisbar (Nachweisgrenze $0.2 \mu\text{g}$). Die DC-Prüfung auf Phenolcarbonsäuren ist daher für die Beurteilung von Abbauvorgängen bei der Trocknung und Lagerung der Artischockenblätter und somit für die Qualitätskontrolle der Droge und ihrer Zubereitungen unentbehrlich.

Für die Identitätsprüfung von Drogenmustern oder Extrakten, in denen kein Cynarin mehr nachweisbar ist, sind daher die Flavonoide heranzuziehen.

Für die DC der flavonoiden Inhaltsstoffe ist das sonst gebräuchliche Fließmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser in der Komponentenzusammensetzung 10:2:3 nicht verwendbar, da die R_f -Werte von Cynarin und Chlorogensäure mit denen der Flavonglykoside zusammenfallen. Gute Trennergebnisse erzielten wir dagegen mit dem gleichen Laufmittelsystem wie bei der DC der Phenolcarbonsäuren. Die Auswertung erfolgte durch Besprühen mit Naturstoffreagens und Polyäthylenglykol und anschließendes Betrachten im langwelligen UV-Licht bei 366 nm (68). Dabei fluoreszierten die Phenolcarbonsäuren türkis bis hellgelb, während die drei Luteolinglykoside orange Fluoreszenz ergaben (s. Abb. 1, S. 16 (B)).

Die türkisfarbenen Flecken bei R_f 0.34; 0.64; 0.8; 0.84 und 0.91 entsprechen den unbesprüht blaufluoreszierenden Phenolcarbonsäuren. Lediglich das Cynarin bei R_f 0.5 erscheint nach dem Besprühen mit dem genannten Flavon-Reagens unter dem langwelligen UV-Licht nun gelb. Der oberste der drei orangefarben fluoreszierenden Flecke entspricht dem Cynarosid. Bei den unteren beiden (R_f 0.19 und 0.31) dürfte es sich um Scolymosid und Cynarotriosid handeln.

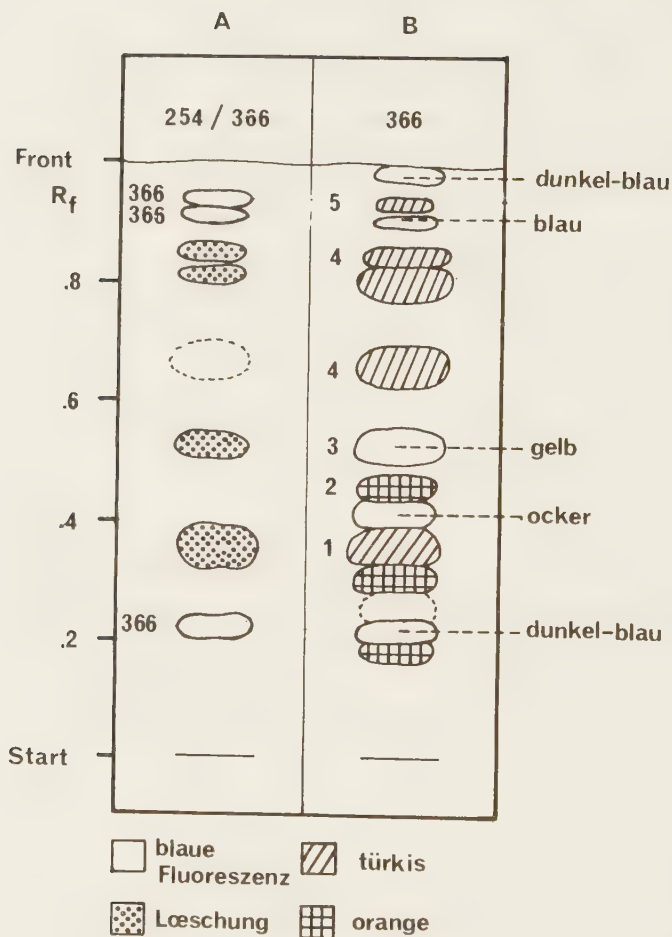


Abb. 1

DC des Äthanolauszuges aus Folia Cynarae auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3)

Detektion: unbesprüht im UV-Licht 254 nm und 366 nm (A)

besprüht mit Naturstoffreagens + Polyäthylenglykol (B)

Konzentration: 20 g Droge/25 ml DC-Auftragung: 0.05 ml

1 = Chlorogensäure 2 = Cynarosid 3 = Cynarin
4 = Isochlorogensäure 5 = Kaffeesäure

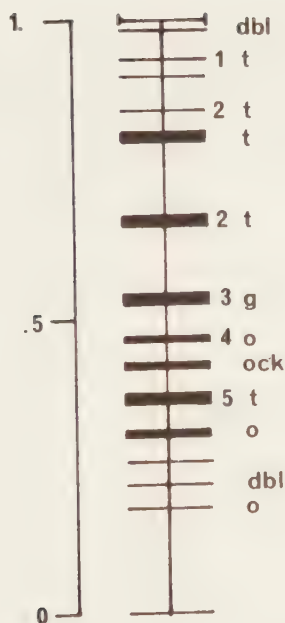


Abb. 2

Folia Cynarae

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3)

Detektion: besprüht mit Naturstoffreagens + Polyäthylen-glykol anschließendes Betrachten im UV-Licht 366 nm

1 = Kaffeesäure

2 = Isochlorogensäure

3 = Cynarin

4 = Cynarosid

5 = Chlorogensäure

dkbl = dunkelblau

t = türkis

g = gelb

o = orange

ock = ocker

Der Vorteil des verwendeten Laufmittelsystemes Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3) besteht darin, daß man in einem Arbeitsvorgang sowohl die Phenolcarbonsäuren als auch die Flavone auftrennen und nachweisen kann. Man trägt lediglich die Extrakte und Testsubstanzen zweimal in derselben Konzentration auf eine Platte auf und besprüht nach Entwicklung unter Abdeckung jeweils einer Plattenhälfte mit dem für die jeweiligen Inhaltsstoffgruppen spezifischen Reagens. So liefert die DC eine schnelle Methode zur Identitäts- und Qualitätskontrolle.

Für eine exakte Qualitätsbeurteilung der Droge und ihrer Zubereitungen war keine der bis dahin bekannten Wertbestimmungsmethoden geeignet.

2. Quantitative Bestimmung des Cynarins in Folia Cynarae und deren Zubereitung

Die meisten der bisher angewandten Farbreaktionen zur quantitativen Bestimmung des Cynarins sind nicht spezifisch. NICHIFORESCU und CUCU⁽⁶¹⁾ hielten zwar nach kritischen Untersuchungen der kolorimetrischen Methoden die auf einer Nitrirung beruhende Farbreaktion der Phenolcarbonsäuren mit Arnows-Reagens für Cynarin spezifisch, doch zeigten CONSTANTINESCU und Mitarb.⁽⁶⁶⁾, daß alle Hydroxyflavone, die OH-Gruppen am C₃ und C₄, enthielten, hiermit ebenfalls reagieren. Da sich alle Flavonoide der Cynara-Blätter, die manchmal über 50% der Gesamtmenge der Polyphenole ausmachen, vom Luteolin ableiten, ist auch diese Methode nicht spezifisch bzw. nur zur Bestimmung von Einzelsubstanzen anwendbar.

Die spektralphotometrische Bestimmung ist außerdem gut nur auf Einzelsubstanzen anwendbar. Bei Vorliegen von Substanzgemisch, wie dies bei Drogenauszügen in der Regel der Fall ist, ist die zumeist ungenügende Trennung der Verbindungen ein zu großes Hindernis. Bei allen bisher bekannten Methoden, die auf der Bestimmung des Cynarins nach chromatographischer

Trennung beruhen, stellt die ungenügende Abtrennung der Chlorogensäure das Hauptproblem dar. Cynarin und Chlorogensäure liegen in jedem der bisher zur Auftrennung verwendeten Laufmittelsysteme dicht untereinander oder überlappen sich teilweise.

a) Cynarin Eichgerade

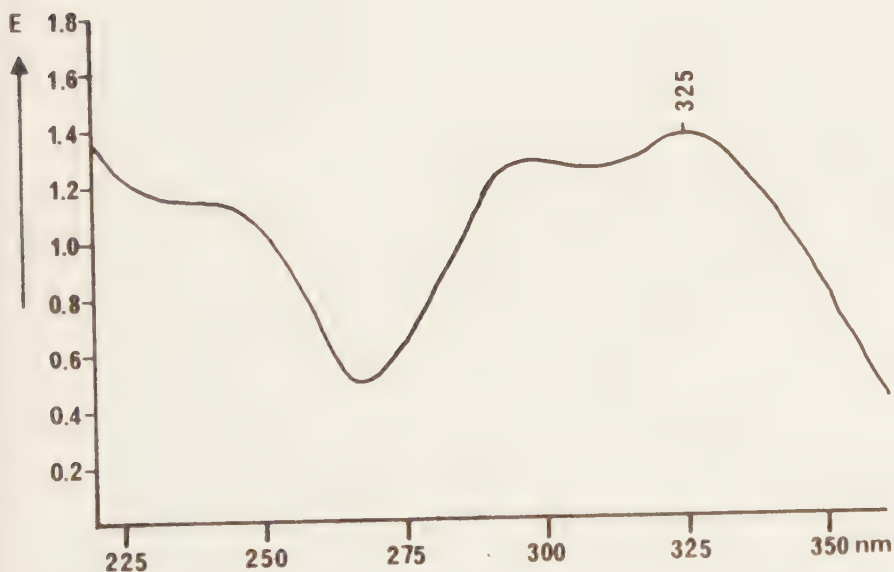


Abb. 3

UV-Spektrum des Cynarins in MeOH

Reines Cynarin besitzt bei 325 nm einen E 1% von 603 und ist im Konzentrationsbereich von 20 µg bis 80 µg im Spektralphotometer gut meßbar. Es liefert gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz eine ideale Gerade. Wir verwendeten zum Aufstellen der Eichgerade eine 0.1%ige methanolische Cynarinlösung.

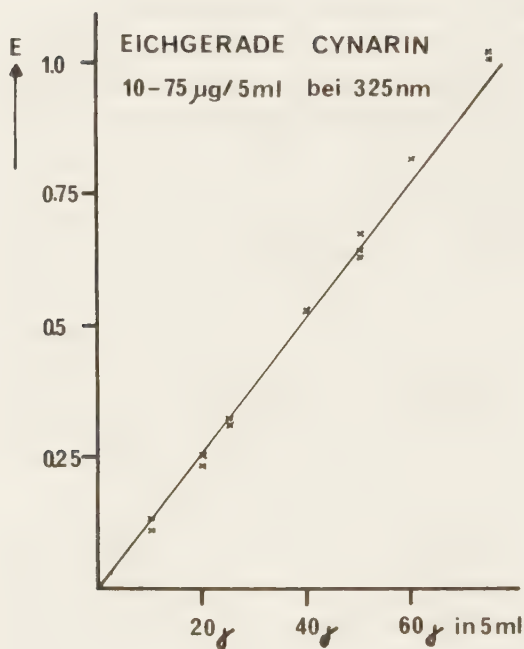


Abb. 4

Eichgerade des Cynarins in MeOH

Um die Genauigkeit der Bestimmungsmethode zu überprüfen, führten wir für 16 Werte einer Cynarinbestimmung (Tabelle 5, S. 21) eine Fehlerrechnung für den Quotienten $m = \frac{\text{Extinktion}}{\text{mg Substanz}}$ durch.

T a b e l l e 5

mg			0.025			0.05			0.075			0.1		
E	$\hat{A}$	m	E	$\hat{A}$	m	E	$\hat{A}$	m	E	$\hat{A}$	m	E	$\hat{A}$	m
0.305		12.2	0.57		11.4	0.88		11.733	1.1		11.0			
0.295		11.8	0.59		11.8	0.82		10.933	1.12		11.2			
0.32		12.8	0.59		11.8	0.9		12.0	1.1		11.0			
0.32		12.8	0.56		11.2	0.83		11.066	1.08		10.8			

Daraus ergab sich für Cynarin als Mittelwert $\bar{m} = 11.596$.

Die Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{m} - m)^2}{(n-1)}}$

beträgt 0.631875.

Der Variabilitätskoeffizient $v = \frac{s \times 100}{\bar{m}}$

beträgt 5.46%.

Damit genügt die Bestimmungsmethode den praktischen Anforderungen.

b) Durchführung der Bestimmung

Zur Bestimmung des Cynaringehaltes in der Droge und deren Zubereitungen schlägt SCHILCHER^{5b)} zunächst die indirekte spektralphotometrische Methode nach vorheriger chromatographischer Abtrennung des Cynarins vor, wendet sich aber dann der direkten Remissionsmessung zu, da sie bessere Ergebnisse ergab. Auch er erhielt bei der chromatographischen Auftrennung für Cynarin und Chlorogensäure wenig unterschiedliche R_f -Werte.

Der Vorteil der direkten spektralphotometrischen Absorptionsmessung in Remissionsanordnung liegt einmal in der geringen

Menge der einzusetzenden Substanz und zum anderen in der einfachen Handhabung bzw. in der praktisch verlustfreien Bestimmungsmethode. Die Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung des Cynarins in Drogenextrakten und anderen Zubereitungen ist aber eine genügend gute chromatographische Abtrennung des Cynarins von den übrigen Phenolcarbonsäuren, insbesondere der Chlorogensäure. Diese war aber bei allen bisher verwendeten Laufmittelsystemen oder Adsorbentien nicht gewährleistet. Zum Beispiel ergab die Nacharbeit der von COLOMBO⁵⁵⁾ vorgeschlagenen DC auf gepuffertem Kieselgel von pH 2.5, die auch wir in abgeänderter Form lange Zeit verwandten, daß Cynarin nicht genügend scharf von der Chlorogensäure abgetrennt war. Deshalb dürften die hiermit erhaltenen Werte auch überhöht sein.

Somit mußte eine verbesserte Trennmethode ausgearbeitet werden.

Wir versuchten zunächst eine Verbesserung der Trennung durch Chromatographie auf Ionenaustauschern mit basischen Eigenschaften. Wir verwendeten selbstgestrichene DEAE-Cellulose-Platten und entwickelten in 1 n HCl. Diese Methode lieferte eine sehr gute Trennung (s. Abb. 5, S. 24). Da aber selbstgestrichene Platten für eine quantitative Analyse wegen schlechter Reproduzierbarkeit ungeeignet sind, versuchten wir die Chromatographie mit DEAE- und ECTEOLA-Cellulose-Fertigfolien der Fa. Macherey u. Nagel. Wir erzielten das beste Ergebnis auf ECTEOLA-Cellulose mit 10%iger Ameisensäure. Cynarin war bei einem R_f ca. 0.29 zu finden, während die Chlorogensäure einen R_f -Wert von ca. 0.41 aufzeigte. Die beiden Substanzen waren also durch einen R_f -Unterschied von ca. 0.12 gut voneinander abgetrennt.

Als Elutionsmittel für das auf der Platte abgetrennte Cynarin erschien uns 5%ige meth. Ameisensäure am geeignetsten, weil der Säurezusatz die Ablösung des gebildeten Salzes von der basischen Schicht erleichtert. Die durch Messung bei 325 nm erhaltenen Extinktionen lagen im Konzentrationsbereich von

10 - 100 μg auf einer linear verlaufenden Eichgeraden. Beim Vergleich unserer Ergebnisse vor und nach der DC-Trennung ergab sich aber im genannten Konzentrationsbereich ein Substanzverlust um ca. 40%. Demnach war auch diese Methode für die Praxis unbrauchbar. Wegen der guten Trennung der beiden Substanzen wäre sie allerdings für die von SCHILCHER vorgeschlagene direkte Remissionsmessung geeignet. Wir gingen nunmehr auf das Adsorbens Kieselgel über. Das beste Ergebnis erhielten wir mit Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3), das wir auch zur Identitätsprüfung vorschlugen und dort bereits genannt haben (siehe Seite 14). Als geeignetes Eluiermittel erwies sich Methanol.

Die Eichgerade wurde mit 10 bis 50 μg Cynarin puriss. der Fa.Roth, die ebenfalls über die Platte gelaufen und mit den gleichen Mengen Methanol eluiert worden waren, aufgestellt (s.Abb. 6, S. 25). Sie verläuft in dem angegebenen Konzentrationsbereich linear. Die Extinktionen liegen zwischen 0.11 (10 μg) und 1.1 (75 μg).

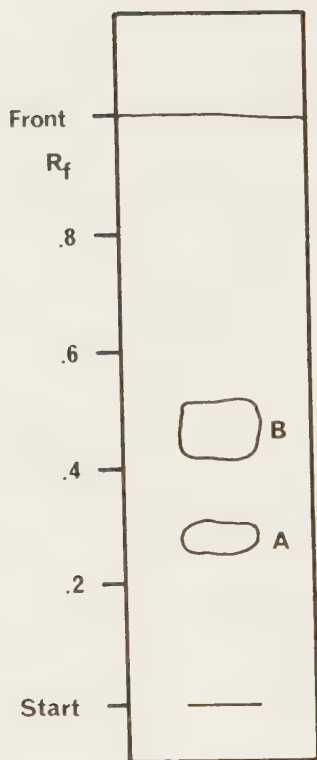


Abb. 5

DC eines Methanolauszuges aus Folia Cynarae auf DEAE-Cellulose
(selbstgestrichen)

Laufmittel: 0.1 n HCl

Detektion: UV-Licht 366 nm

I = Cynarin

II = Chlorogensäure

EICHGERADE CYNARIN

25-100 μ g 5ml bei 325 nm

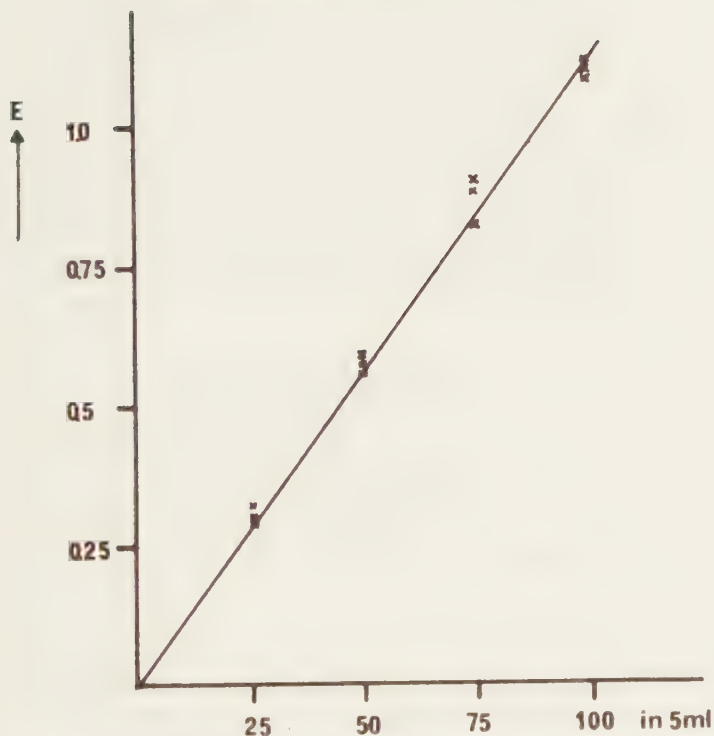


Abb. 6

Eichgerade des Cynarins nach Kieselgel-Chromatographie und Elution mit Methanol von der Platte

Wir verglichen die Ergebnisse der Direktbestimmung von reinem Cynarin mit denen nach der DC. Wie Reihenversuche ergaben, differieren die Werte im Konzentrationsbereich von 0.025 bis 0.1 mg/2 ml um 2 bis 10%. Damit erübrigt sich die Einführung eines Korrekturfaktors. Bei Applikation höherer Cynarinmengen liegen die prozentualen Verlustmengen über 10%.

Für die Berechnung des Prozentgehaltes an Cynarin stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder entnimmt man der Eich-

geraden die Extinktion für eine bestimmte Menge Cynarin oder man läßt bei jeder Bestimmung eine definierte Menge Testsubstanz auf der Platte mitlaufen, deren gemessene Extinktion dann die Grundlage für die Berechnung darstellt. Steht eine Testsubstanz zur Verfügung, so ist diese Methode zu bevorzugen, da hier Extrakt und Standard denselben Bedingungen unterworfen sind. Der quantitativen Auswertung von Bestimmungen aus der Droge und beliebiger galenischer Zubereitungen kann dann unter Einhaltung der angegebenen Versuchsbedingungen folgende Formel zu Grunde gelegt werden:

$$\% \text{ Cynarin} = \frac{5 \cdot E_A \cdot G}{E_{ST} \cdot 10^2 \cdot G_D}$$

E_A = gemessene Extinktion der Analyse

E_{ST} = Extinktion des Standards

G_{ST} = Einwaage des Standards in μg

G_D = eingesetzte Drogenmenge des frischen oder getrockneten Pflanzenmaterials bzw. Volummenge der extrahierten Tinktur

Anwendungsbeispiel:

Einwaage	Droge	Standard Cynarin
	3.87/25 ml	5 mg/5 ml
DC-Auftragung	0.05	50 μg $\hat{=}$ 0.05 ml
Extinktion	0.46	0.675

$$\% \text{ Cynarin} = \frac{5 \cdot 0.46 \cdot 50}{0.675 \cdot 10^2 \cdot 3.87}$$

$$\% \text{ Cynarin} = \underline{0.44}$$

Die untersuchte Droge enthielt 0.44% Cynarin.

Eine optimale Extraktion des Cynarins aus der Droge oder deren Zubereitungen gelang durch 12stündige Behandlung mit Äthanol im Soxhletapparat. Andere Lösungsmittel wie Wasser, Methanol oder essigsäures Aceton lieferten im Vergleich zur Äthanolextraktion keine höheren %-Werte. Auch die Wirbelextraktion von 5 Min. mit Äthanol im Omnimixer (Fa. Sorvall, Newtown/USA), die speziell für kleine Drogenmengen gedacht ist, lieferte im Durchschnitt um 20% schlechtere Ergebnisse. So erhielten wir aus frischen Blättern durch Soxhletextraktion 0.032% Cynarin, durch Wirbelextraktion aber nur 0.026% Cynarin.

Die in der Literatur gelegentlich vorgeschlagene Vorreinigung der Artischockenextrakte durch eine Fällung mit Bleiacetat erscheint uns nicht notwendig, da sich die äthanolischen Extrakte gut chromatographieren ließen und die einzelnen Substanzen sich in oben genanntem Fließmittel scharf und ohne Fleckschleppung voneinander abtrennen.

Außerdem riskiert man bei einer Bleifällung infolge teilweiser Adsorption von Cynarin an den Niederschlag einen Substanzverlust.

Wir verfahren nach folgender Methode:

a) für die Droge

Das Drogenpulver bzw. die geschnittene Frischdroge wird über 12 Stdn. einer kontinuierlichen Soxhletextraktion unterworfen, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf ca. 15 ml eingeeengt, in ein 25 ml-Meßkölbchen übergeführt und bis zur Marke mit Äthanol aufgefüllt. Davon werden 0.05 ml auf die DC-Platte aufgetragen.

b) für einen Artischockenpreßsaft

100 ml des Artischockensaftes werden am Rotationsverdampfer bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt. Der Rückstand wird mit 40 ml Aceton, dem ca. 0.5% Eisessig zugefügt wurden, versetzt und geschüttelt. Hierbei lösen sich Cynarin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und andere Polyphenole. Zur quantitativen Lösung wird dieser Vorgang

zweimal wiederholt und die gesammelten, filtrierten Acetonextrakte am Rotationsverdampfer stark eingeeengt und dann in einem 25 ml-Meßkölbchen bei 20° bis zur Marke aufgefüllt. Davon werden 0.05 ml aufgetragen.

Man chromatographiert im System Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3) über eine Wegstrecke von 15 cm. Mitgelaufenes Cynarin, das sich im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) durch Fluoreszenzminderung auszeichnet und im langwelligen UV-Licht (366 nm) dunkelblau fluoresziert, besitzt einen R_f von ca. 0.5. Die markierten Cynarinflecke werden nach dem Abschaben von der Platte und Übertragen in Reagensgläser mit 2 ml Methanol p.A. versetzt und 2 Min. auf dem Whirlimixer eluiert. Die vom Kieselgel abzentrifugierte klare überstehende Lösung wird sofort der photometrischen Bestimmung im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 325 nm unterworfen.

Da die Folia Cynarae selbst im getrockneten Zustand oft noch einen hohen Restwassergehalt aufzeigen (frische Blätter ca. 92.71%) ist für die Berechnung des Cynaringehaltes zu beachten, daß immer auf das gleiche Gewicht bezogen wird. Wir bestimmten bei allen von uns untersuchten Drogenmustern den Trocknungsverlust nach DAB 7 BRD und nannten das nach Abzug des Verlustes erhaltene Gewicht "Trockengewicht" der Droge.

c) Diskussion der Ergebnisse

Wir verglichen die Ergebnisse der nach der von SCHILCHER publizierten Methode mit den unseren. Für diese Untersuchung verwendeten wir zwei unterschiedliche Chargen eines Artischockenfrischpflanzenpreßsaftes des Handels.

Wir verwendeten Cellulose-Alufolien Merck und entwickelten in 15%iger Essigsäure.

Wie die Tabelle 6, S. 29, zeigt, ergibt sich nach den beiden Methoden im gleichen Artischockensaft ein sehr unterschiedlicher Cynaringehalt:

T a b e l l e 6

	Artischockensaft I	Artischockensaft II
Bestimmung SCHILCHER		
Cellulose	0.071%	0.034%
15%ige Essigsäure		
Eigene Bestimmung		
Kieselgel	0.049%	0.024%
Äthylacetat-Ameisen- säure-Wasser(20:2:3)		

Die um ca. 40% höheren Werte bei der erstgenannten Methode dürften durch die teilweise Überlappung von Cynarin und Chlorogensäure im gewählten Konzentrationsbereich herrühren, wie man bei Mitchromatographie von reinem Cynarin sehr deutlich feststellen kann. Wählt man aber einen niedrigeren Konzentrationsbereich, so sind die Extinktionswerte zu niedrig und nicht mehr exakt meßbar. Andererseits treten bei der von Schilcher publizierten Methode noch zwei weitere Fehlerquellen auf:

1. Jeder Pyridinzusatz zur Elution des Cynarins von der Platte verschiebt das Maximum von 325 nm nach 337 nm, so daß bei 325 nm nicht einmal mehr im Kurvenanstieg gemessen wird.
2. Die Verwendung von Cellulose als Adsorbens liefert meist höhere Verlustquoten. Beim Vergleich ergaben 30 µg Cynarin puriss. nach der Cellulosechromatographie eine Extinktion von 0.21, nach Kieselgelchromatographie dagegen eine Extinktion von 0.29. Die direkte Messung dieser Lösung ergab für 30 µg eine Extinktion von 0.305.
Beim Vergleich des von uns in der Droge ermittelten Prozentgehaltes von 0.36 bis 0.44% Cynarin (bezogen auf Trockengewicht) mit Angaben der Literatur, ergibt sich eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung. Sowohl PARIS und HERISSET⁶⁹⁾ als auch SCEMAMA und GARDE⁶³⁾ geben für Folia Cynarae je nach der Qualität der untersuchten Droge einen Gehalt an Cynarin zwischen 0.18 und 0.52% an (bezogen auf das Trockengewicht).

ÜBER DIE STABILISIERUNG DER DROGE FOLIA CYNARAE UND IHRER ZUBEREITUNGEN

I. Bisherige Untersuchungen

Es existieren bereits einige Arbeiten, die sich mit den geeignetsten Trocknungsbedingungen für die Cynara-Droge beschäftigen.

CONSTANTINESCU und Mitarb.⁶⁵⁾ machten die Beobachtung, daß Drogenextrakte im Gegensatz zu den Blättern kein Cynarin mehr enthalten. Dieser Befund deckt sich mit unseren Beobachtungen. Er vermutet, daß es bei der Herstellung zerstört wird. Die therapeutische Wirksamkeit dieser Extrakte erklärt er durch den Gehalt an den dem Cynarin verwandten Polyphenolen.

NICHIFORESCU und CUCU⁷⁰⁾ zeigten, daß die Trocknungsweise der Blätter den Gehalt an Kaffeesäure-Verbindungen beeinflusst. Bei späteren Untersuchungen stellte er fest⁷¹⁾, daß bei Extrakten, die mit Alkohol-Wasser-Mischungen be-
reitet wurden, der Gehalt als eine Funktion von Konzentration und Temperatur um mehr als 50% abnimmt. Den Verlust konnte er aber vollständig verhindern, wenn er die frisch geernteten Blätter 5 Min. alkoholischen Dämpfen aussetzte. Bei Behandlung der Blätter mit Zitronensäure, Natriumchlorid, Natriummetabisulfit, Na_2SO_4 oder MgSO_4 vor der Extraktion betrug der Verlust nur 10%. Dieser Vorgang aber ist nicht beständig; extrahiert man nämlich solch vorbehandelte Blätter mit Alkohol-Wasser-Mischungen, so tritt wieder ein hoher Wirkstoffverlust ein. Er⁷²⁾ behandelt deshalb die Blätter zur Inaktivierung der Enzyme 12 Std. mit Äthanol, verdünnt dann mit H_2O auf 50% und extrahiert wie gewöhnlich. NETIEN und ROULIER⁷³⁾ stellten fest, daß Droge aus dem Handel von wesentlich schlechterer Qualität ist, als Proben, die sie selbst unter den besten Bedingungen geerntet und getrocknet haben.

Die ausführlichste Arbeit über den Einfluß der Trocknung auf den Gehalt der Polyphenole lieferten PARIS und HERISSET⁶⁹⁾. Sie stellten fest, daß die im Sommer gesammelten Blätter einen niedrigeren Wassergehalt besitzen, als die im Herbst gesammelten, was für die Trocknung einen großen Vorteil darstellt. Die "wertvollsten" Blätter sind diejenigen, die im Sommer, noch vor der Erzeugung der Blütenköpfchen, gewonnen werden. Die höchsten Erträge und den höchsten Gehalt an wirksamen polyphenolischen Derivaten liefert die Varietät "A. gros Camus de Bretagne-A. de Macau ". Sie empfehlen eine Trocknung der ganzen oder geschnittenen Blätter bei 40⁰, da die Trocknung bei normaler Temperatur zwar im Labor gute Ergebnisse liefert, jedoch in der Industrie nicht benutzt werden kann. Eine Vorbehandlung der Blätter mit 1%iger Zitronensäurelösung beeinflußt den Gehalt an Wirkstoffen wenig. Dieses Verfahren lieferte immerhin noch 42% des ursprünglich vorhandenen Cynarins. Sie gaben an, daß 25 - 74% der Chlorogensäure erhalten bleiben und daß die Schwankungen im Flavonoid-Gehalt genau so groß wie die des Cynarins sind. Sie empfehlen den zur Zeit verwendeten wässrigen Extrakt durch einen Trockenextrakt zu ersetzen, der wie folgt zubereitet wird:

- a) Stabilisierung der getrockneten Blätter mit kochendem Alkohol (80⁰)
- b) anschließende Verdunstung des Lösungsmittels der erhaltenen Extraktlösung.

II. Eigene Untersuchungen

Da der rasche Abbau des Cynarins auf der enzymatischen Tätigkeit der Phenoloxidasen beruht und dieser Vorgang, der im wässrigen Milieu besonders rasch vor sich geht, durch den hohen Wassergehalt der Artischockenblätter von ca. 90% stark begünstigt wird, versuchten wir eine Stabilisierung der Inhaltsstoffe durch Schnelltrocknung der Blätter und Inaktivierung der Enzyme zu erreichen.

Aufbauend auf den umfangreichen Untersuchungen von PARIS und HERESSET untersuchten wir zunächst den Einfluß der Trocknungsweise frischer Blätter auf den Gehalt an Cynarin. Hinsichtlich der Trocknungstemperatur konnten wir die von PARIS und HERISSET⁶⁹⁾ gemachten Beobachtungen bestätigen, wonach eine Temperatur über 40° einen schnellen Cynarinabbau zur Folge hat. Wir stellten fest, daß bereits eine Erhöhung der Trocknungstemperatur von 40° auf 50° zu einem Cynarinverlust von ca. 10% führt.

Die Trocknung bei normaler Raumtemperatur an der Luft lieferte bei 10 g Droge gute Ergebnisse, ist aber auf die großen Mengen, die die Industrie benötigt, nicht anwendbar. Obengenannte Autoren erhielten bei kleinen Drogenmengen nach 3 Wochen Trocknung eine Droge mit einem Wassergehalt von 10.8%, bei 60 kg jedoch nach derselben Zeit einen Wassergehalt von 30.8%, wobei die Droge sehr unansehnlich geworden war.

Als bestes Trocknungsverfahren von frischem Material bot sich die Lyophilisierung an. Wir erhielten dadurch eine Droge, die schon vom Aussehen her befriedigte und im Unterschied zu den im Trockenschrank getrockneten Mustern keinerlei braune oder schwärzliche Verfärbungen aufwies. Der durch Bestimmung des Trocknungsverlustes ermittelte Restwassergehalt betrug nach der Gefriertrocknung noch 10.16% und wir konnten durch diese Trocknungsmethode 81.25% des Cynaringehaltes der frischen Pflanze erhalten.

Unter "Trockengewicht" der Pflanze oder Droge verstehen wir immer das Gewicht, das man über die Bestimmung des Trocknungsverlustes nach DAB 7 BRD erhält (siehe auch S. 28).

In Tabelle 7 sind vergleichend die Werte für den Cynaringehalt und Wassergehalt einer frischen und auf verschiedene Art getrockneten Droge aufgeführt. Die Prozentangaben des Cynaringehaltes beziehen sich immer auf das nach DAB 7 ermittelte Trockengewicht der Artischockenblätter.

T a b e l l e 7

	Wassergehalt %	Cynaringehalt % (bezogen auf Trockengewicht)
frische Droge	92.71	0.44 (0.032% bezogen auf das Frisch- gewicht)
geschnittene Blätter bei normaler Temperatur luftgetrocknet	7.52	0.40
bei 40° getrocknet	12.73	0.22
bei 60° getrocknet	12.5	0.11
gefriergetrocknet	10.16	0.36

Wie aus der Tabelle ersichtlich, besteht die beste Trocknungsmöglichkeit für Artischockenblätter darin, daß man sie unter normalen Bedingungen an der Luft trocknen läßt. Allerdings ist diese Methode nur, wie bereits erwähnt, für die kleinen Mengen (10 bis 100 g) geeignet, die wir für unsere Untersuchungen im Laboratorium benötigen. Für größere Quantitäten dürften sie sich, schon wegen der langen Trocknungszeit, wenig eignen.

Die Gefrier Trocknung dürfte die Methode der Wahl sein, weil sie im Vergleich zu den anderen Trocknungsmethoden (siehe Tabelle 7) den höchsten Gehalt an Cynarin gewährleistet.

Außerdem unterliegt die so erhaltene Droge durch den geringen Restwassergehalt nur noch unwesentlich einem weiteren Wirkstoffverlust. Wir stellten nach Aufbewahrung der lyophilisierten Droge über ein halbes Jahr keinen nennenswerten Verlust an Cynarin fest.

Weiterhin untersuchten wir die Stabilität eines Artischocken-frischpreßsaftes bei der Lagerung.

Wir stellten fest, daß Wärmeeinwirkung zu einem Wirkstoffverlust von über 30% führt.

Der Verlust an Cynarin beträgt bei einem 2 Jahre lang unter normalen Bedingungen gelagerten Frischsaft über 50%. Den gleichen Wirkstoffverlust weist auch ein über denselben Zeitraum hinweg tiefgefroren gelagerter Saft. Auch bei einem im Parallelversuch gelagerten Acetonextrakt aus dem Frischpflanzensaft konnten wir nach 2 Jahren keinen höheren Cynaringehalt feststellen.

Durch Zusatz von 1%iger Zitronensäurelösung oder 50%iger Natriumchloridlösung konnten wir den Wirkstoffverlust um ca. 13% vermindern.

Eine relativ geringe Abnahme um nur 14% des ursprünglich vorhandenen Cynarins wies dagegen ein 2 Jahre gelagerter lyophilisierter Frischpflanzenpreßsaft auf.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tabelle 8, S. 35, zusammengefaßt.

T a b e l l e 8

	Cynaringehalt in 100 ml Preßsaft %
100 ml frischer Preßsaft	0.025
66 Stdn. bei 40 ⁰	0.017
228 Stdn. bei 40 ⁰	0.015
2 Jahre gelagert norm.Bedingungen	0.012
wasserfreier Acetonextrakt	0.014
tiefgefroren gel.	0.0118
Frishpflanzensaft + 1%ige Zitronensäurelösung	0.015
Frishpflanzensaft + 50%ige NaCl-Lösung	0.016
lyophilisierter Frishpflanzen- preßsaft	0.021

OLEAE EUROPAEA

A. EINLEITUNG

I. Arzneiliche Verwendung der Ölbaumblätter

Als Stammpflanze für die Droge Folia Oleae sind die verschiedenen Kulturformen des Ölbaumes, *Olea europaea* L. (Oleaceae), anzusehen. Diese stammen wahrscheinlich von der Wildform subsp. *silvestris* (Hiller) ROUY (= *Olea oleaster* HOFFM. et LINK) ab⁷⁴⁾. Neben der Ölgewinnung fanden Aufgüsse von Olivenblättern schon im Altertum als Adstringens, Antimalariamittel, Antipyreticum, Tonikum und Antihypertonikum Verwendung⁷⁵⁾. Nach SPRECHER von BERNEGG⁷⁶⁾ dienten die Blätter zur Heilung von Geschwüren. Im Mittelalter geriet der arzneiliche Gebrauch der Ölbaumblätter und -früchte, bis auf die Anwendung des Öles, nahezu in Vergessenheit. Dies änderte sich erst, nachdem im Jahre 1938 der französische Arzt MAZET⁷⁷⁾ über gute Erfolge mit Blätterextrakten bei Hypertonie berichtete. In rascher Folge erschienen chemische und klinische Arbeiten zu diesem Thema.

Die klinischen Arbeiten von LECLERC⁷⁸⁾ in Frankreich, DE NUNNO und CAPRETTI⁷⁹⁾ in Italien und die Tierversuche von BRUNET und OLIVIERO⁸⁰⁾, JARDON⁸¹⁾ und CAPRETTI⁸²⁾ haben die von MAZET gefundene blutdrucksenkende Wirkung bestätigt. Abweichend wird dort nur der Wirkungsmechanismus beurteilt und Uneinigkeit besteht darin, welchem Inhaltsstoff die Wirkung zuzuschreiben ist. BALANSARD und DELPHAUT⁸³⁾ nennen ein Oleosid, SAMUELSSON⁸⁴⁾ dagegen das Cholin als Wirkprinzip. KOSAK und STERN⁸⁵⁾ und BLAZEK, JANKU und Mitarb.⁸⁶⁾ haben dann im Jahre 1957 festgestellt, daß es sich nicht um Cholin handeln dürfte.

Nach der Isolierung und Aufklärung des Oleuropeins haben umfassende Untersuchungen von PETKOV und MANOLOV⁸⁷⁾ gezeigt, daß das den Iridoiden zugehörige Oleuropein eine deutliche, stets reproduzierbare Senkung des Blutdrucks

bei verschiedenen Tierarten mit normalem und hohem Blutdruck bewirkt. Die pharmakologische Analyse erlaubt, die hypotensive Wirkung des Oleuropeins als einen komplexen, sowohl zentralen als auch peripher bedingten Mechanismus anzunehmen. Nachgewiesen wurde ferner, daß das Oleuropein erweiternde Wirkungen auf die Herzkranzgefäße besitzt, krampflösende Eigenschaften an der glatten Muskulatur entfaltet und antiarrhythmische Effekte speziell auf das rhythmusgestörte Herz ausübt.

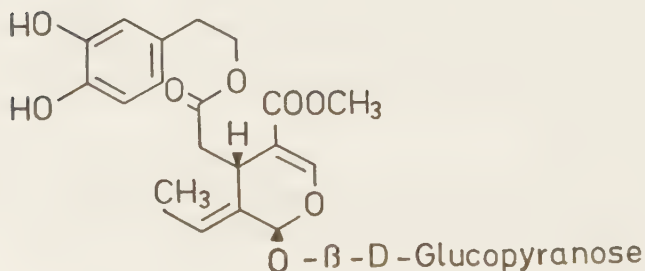
Die von MAZET⁷⁷⁾ zusätzlich festgestellte diuretische Wirkung konnte von BALANSARD und DELPHAUT⁸³⁾ nicht bestätigt werden. Auch die blutzuckersenkende Wirkung konnte bisher noch keinem definierten Wirkstoff zugeordnet werden. Auf diese Wirkung wies als erster LECLERC⁷⁸⁾ hin. JARDON⁸¹⁾ führte sie ebenfalls auf das Oleuropeosid (siehe auch S.39) zurück.

Nach unseren heutigen Kenntnissen besitzen Olivenblätter eine hypotensive, diuretische und hypoglykämische Wirkung. Allein der für die blutdrucksenkende Wirkung verantwortliche Stoff konnte bisher mit Sicherheit festgestellt werden^{94 a))}.

II. Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Olivenblätter und ihre pharmakologische Wirkung

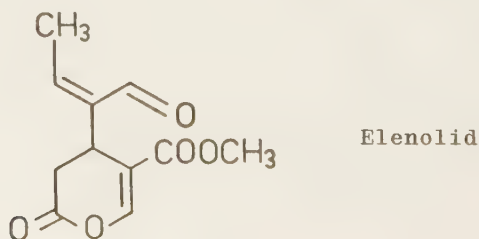
Bereits 1836 gewann LANDER⁸⁸⁾ aus Blättern von *Olea europaea* einen kristallinen Bitterstoff. Die gleiche Substanz ließ sich auch aus unreifen Oliven darstellen. Sie wurde "Olivamarin" genannt⁸⁹⁾. 1908 isolierten BURQUELOT und VINTILESCO^{90,91)} aus frischen Olivenblättern 0.75% und aus jungen Oliven 2% eines bitteren Glykosids, das sie Oleuropeosid oder "Oleuropein" bezeichneten. Auch später isolierte sogenannte "Oleuropeine"^{92,93)} erwiesen sich wie das zuerst isolierte als Stoffgemische (z.B. Oleuropein + Verbascosid; Oleuropein + Saccharoseester der Oleuropeinsäure). Erst PANIZZl und Mitarb.⁹⁴⁾ konnten

den Bitterstoff Oleuropein rein gewinnen und seine Struktur klären. Die Ermittlung der genauen Stereochemie erfolgte durch INOUE⁹⁵⁾. Danach handelt es sich um ein glykosidisches Enolacetat mit dem C-Gerüst eines Monoterpens, womit auch die große chemische Verwandtschaft zu den Bitterstoffen der Gentianaceen-Familie gegeben ist. Man zählt das Oleuropein zu der Klasse der Iridoide. Es ist gleichzeitig ein Vertreter der iridoiden Verbindungen vom Gentianintypus und der Alkylphenole vom Brenzkatechintyp.

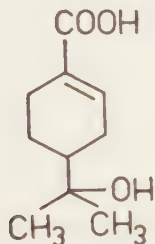


Oleuropein

Das von VEER⁹⁶⁾ 1957 isolierte Elenolid $C_{11}H_{12}O_5$ ist ein Lacton, das sich bei der Vakuumsublimation als Kunstprodukt bildet. Sein biogenetischer Vorläufer ist das Oleuropein. Die Struktur dieses ebenfalls blutdrucksenkenden Elenolids klärten BEYERMAN und Mitarb.⁹⁷⁾.



Das Oleuropein wird in allen Organen der Pflanze von einem Saccharoseester^{94 c))} der Oleuropeinsäure begleitet, die bereits MECHOULAM⁹⁸⁾ in seinem "Oleuropein" gefunden hatte.

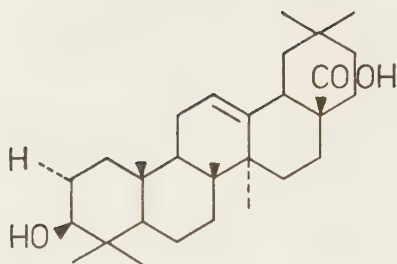


Oleuropeinsäure

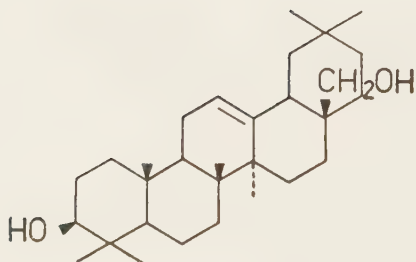
SCARPATI und TROGOLO⁹⁹⁾ klärten die Lage der Esterbindung. Bei weiteren Versuchen konnten PANIZZI und Mitarb.^{94 c))} den β -(3,4-Dihydroxyphenyl)äthylalkohol isolieren. Er ist auch Bestandteil des aus *Echinacea angustifolia* DC. isolierten Echinacosids.

BALANSARD und DELPHAUT⁸³⁾ isolierten das N-haltige Pseudo-saponin Oleosid, über dessen chemischen Aufbau aber keine Einzelheiten vorliegen. Daneben wurden zwei im Tierversuch blutdrucksenkende Rohsaponine isoliert.⁸¹⁾

An flavonoiden Verbindungen führen die Blätter von *Olea europaea* hauptsächlich Luteolin, Luteolin-7-O-glucosid, ein Luteolin-O-tetraglucosid, Olivin und Olivin-4'-O-diglucosid. Das Olivin soll nach BOCKOVA und Mitarb.¹⁰⁰⁾ ein Tetrahydroxy-monomethoxy- β -methylchalkon sein, wogegen HÄNSEL¹⁰¹⁾ die angegebene Chalkonform (= Olivin) für unwahrscheinlich hält. 1908 wurden aus Blättern von *Olea europaea* 3.4% eines neuen Stoffes isoliert, den man "Oleanol" nannte¹⁰²⁾. Diese Verbindung wurde später als Oleanolsäure¹⁰³⁾ identifiziert. Sie wird von Erythrodiol (=Homoolestranol) begleitet^{104,105)}. Daneben wurden weitere Triterpenverbindungen sowie Sterine, meist unbekannter Konstitution, isoliert^{102,106,81)}.



Oleanolsäure



Homoolestranol

Wie die meisten Oleaceen speichert auch *Olea europaea* reichlich Mannit in den Blättern (0.24%)¹⁰²⁾.

In den letzten Jahren wurden Chinaalkaloide mit Cinchonidin als Hauptalkaloid als potentielle Wirkstoffe gefunden¹⁰⁷⁾.

B. ZUR ANALYTIK DER INHALTSSTOFFE

I. Bisherige Analysenmethoden

Die einzige bisher beschriebene quantitative Wirkstoffanalyse stammt von COHEN¹⁰⁸). Er extrahierte den Bitterstoff aus Oliven mit Wasser, schüttelte das Filtrat mit 1%iger Gelatinelösung in gesättigter NaCl-Lösung, gab Aceton dazu und schüttelte die Acetonlösung erneut mit Aluminiumoxid. Die dekantierte Lösung wurde bei 345 nm gegen reines Aceton gemessen.

In einer späteren Veröffentlichung¹⁰⁹) schreibt der Autor, daß es sich bei dem von ihm untersuchten Bitterstoff nicht um das Oleuropein handelt, sondern um ein anderes bitteres Prinzip. Aus seiner spektralanalytischen Bestimmung ergab sich aber eine gute Übereinstimmung mit der organoleptischen Methode.

II. Eigene Methode der Wirkstoffanalyse und Wertbestimmung

1. Identitätsprüfung eines Olivenblätterrauszuges

a) Chromatographie des Oleuropeins und seiner Abbauprodukte

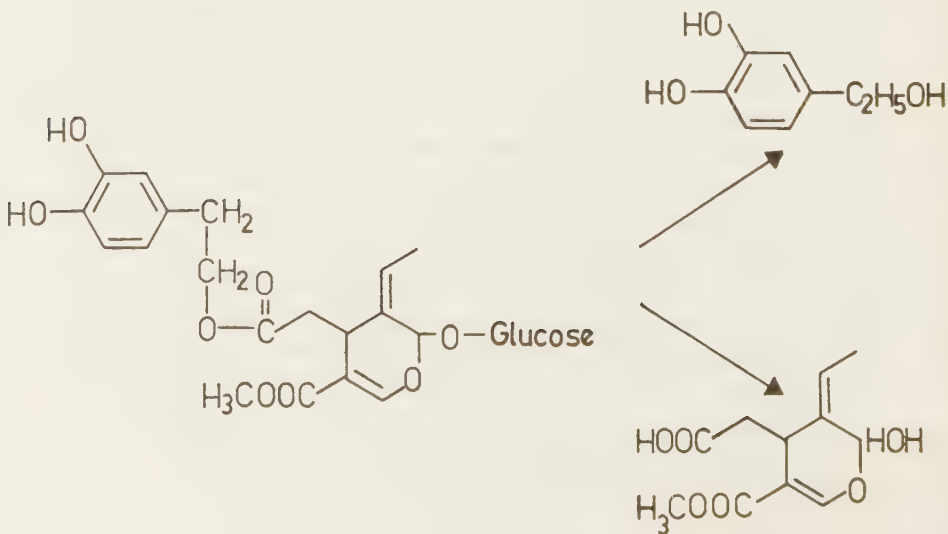
Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse von Äthylacetatausschüttelungen äthanolischer Blattextrakte erhielten wir das in Abb. 7, S. 43, gezeigte Bild. Wir verwendeten Kieselgelfolien mit Fluoreszenzindikator und benutzten das Fließmittel Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3). Die Auswertung erfolgte im kurzwelligen UV-Licht bei 254 nm unter Ausnutzung der Fluoreszenzminderung des Oleuropeins, die bei R_f 0.42 deutlich sichtbar wird. Bei Auszügen aus gelagerten Drogen oder bei der Chromatographie von Fruchtexttrakten erschienen neben dem meist nur noch schwach sichtbaren Oleuropein im oberen R_f -Bereich von ca. 0.8 - 0.9 zwei weitere kräftige Flecke. Die Detektion im Tageslicht erfolgte mit wässriger $FeCl_3$ -

Lösung. Das Oleuropein und die beiden anderen Flecke erscheinen dabei mit der für die Eisen-III-chlorid-Reaktion typischen graugrünen Färbung. Als weiteres Sprühreagens verwendeten wir auch Anthron- H_2SO_4 konz. (0.2%), wobei das Oleuropein mit blaugrüner Farbe erscheint.

Die DC erwies sich vor allem für die Beurteilung von Abbauvorgängen im Lauf der Trocknung und Lagerung der Droge und ihrer Zubereitungen von Vorteil.

Die Mehrheit der Glykoside vom Iridoidtyp ist besonders alkali- und säurelabil. Auch wir beobachteten bei der Chromatographie von Ölbaumblätterextrakten, hergestellt aus gelagerter Droge, im oberen R_f -Bereich zwei zusätzliche Flecke, die ebenfalls, wie bereits erwähnt, die Eisen-III-chlorid-Reaktion geben.

Aus der Literatur¹¹⁰⁾ ist bekannt, daß das Oleuropein bei saurer Hydrolyse in der Kälte in Glucose, 3,4-Dihydroxyphenyläthylalkohol und den Methylester einer Dicarbonsäure gespalten wird. Das Enolhalbacetat dieser Säure stellt das eigentliche Aglucon des Oleuropeins dar. Das ebenfalls in der Literatur genannte Elenolid von VEER und Mitarb.⁹⁶⁾ ist das Lacton der obigen Säure.



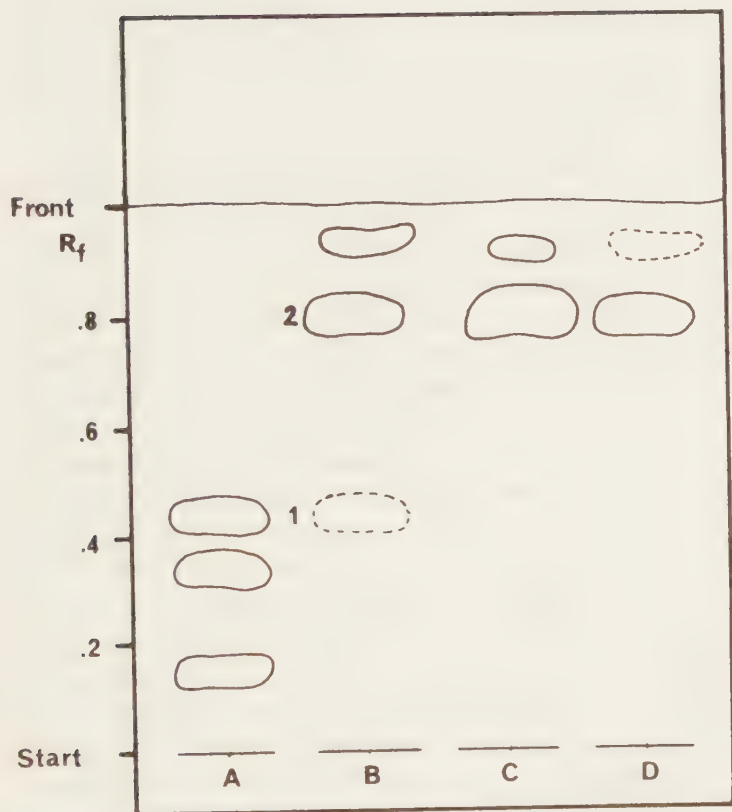


Abb. 7

DC der Auszüge von Folia Oleae frisch (A)
 Folia Oleae gelagert (B)
 konservierten Oliven (C)
 und dem Hydrolysat des Oleuropeins (D)
 auf Kieselgel-Folien Polygram Sil G/UV₂₅₄ (Macherey, Nagel)
 Laufmittel: Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:03)
 Sprühreagens: 10%ige FeCl₃-Lösung
 1 = Oleuropein
 2 = Dihydroxyphenyläthylalkohol

Wir führten eine saure Hydrolyse von Oleuropein durch und erhielten nach Chromatographie im oben genannten Fließmittel anstelle des Oleuropeinfleckes die beiden bereits erwähnten, Eisen-III-chlorid positiven Flecke im R_f -Bereich von 0.78 - 0.93. Die im R_f -Wert tiefere Verbindung erwies sich interessanterweise mit einer Substanz identisch, die wir aus mit Essig und Salz konservierten Oliven des Handels isolieren konnten.

Wir eluierten die genannten Flecke aus dem Kieselgel und fertigten IR-Spektren an. Dabei stellte sich heraus, daß der von uns aus Oliven isolierte Stoff mit dem Hydrolyseprodukt des Oleuropeins identisch war. Das IR-Spektrum deutet darauf hin, daß es sich um den erwähnten Dihydroxy-phenyl-äthylalkohol handelt, wofür auch die positive Eisen-III-chlorid-Reaktion sprach. Da in den Spektren immer auch eine Carbonylbande erschien, war anzunehmen, daß die Verbindung etwas mit Oleuropein verunreinigt war. Hierauf deutete auch der bittere Geschmack des von uns aus den Oliven gewonnenen Auszuges hin.

Den Beweis, daß es sich um den vermuteten 3,4-Dihydroxyphenyl-äthylalkohol handelte, lieferte das Massenspektrum. Wir trennten den Oliven-Extrakt auf Kieselgel-Fertigfolien (Fa. Macherey, Nagel u. Co.) auf und eluierten nach Entnahme der stark fluoreszenzmindernden Zone (R_f 0.78) auf einer kleinen Säule mit Methanol. Das Lösungsmittel dampften wir unter Vakuum ab, lösten den Rückstand in heißem Methylenchlorid und gaben tropfenweise bis zu einer Konzentration von ca. 1:1 siedenden Tetrachlorkohlenstoff hinzu. Dabei kristallisierten Nadeln vom Smp. 80° aus.

Das Massenspektrum zeigte den Massenpeak M^+ bei 154 und starke Peaks bei 123 ($C_7H_7O_2$) und 124 ($C_7H_8O_2$).

Dieser Alkohol ist nach unserer Erfahrung oftmals der einzige Indikator für das Vorliegen einer Ölbaumblätterdroge oder -zubereitung. Bei Extrakten aus länger gelagerten Drogen, bei Tinkturen und einigen Spezialitäten war Oleuropein nur noch schwach sichtbar oder gar nicht mehr vorhanden. Dafür

trat der 3,4-Dihydroxyphenyläthylalkohol sehr kräftig auf dem DC in Erscheinung (s. Abb. 7, S. 43).

Bei der anderen, bereits erwähnten Zone mit höherem R_f könnte es sich um ein Isomeres handeln. Es gibt ebenfalls die Eisen-III-chlorid-Reaktion, zeigt im IR-Spektrum die gleichen Banden und ergibt im MS die gleichen Bruchstücke.

b) Nachweis der flavonoiden Inhaltsstoffe

Zur Chromatographie der flavonoiden Inhaltsstoffe verwendeten wir Kieselgel-Platten 60 F₂₅₄ Merck. Die Entwicklung erfolgte im Fließmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3), die Detektion durch Besprühen mit Naturstoffreagens und Polyäthylenglykol und anschließender Auswertung im langwelligen UV-Licht bei 366 nm. Die Flavone wurden hierbei mit ihren charakteristischen Fluoreszenzfarben sichtbar. Durch Vergleich mit Testsubstanzen identifizierten wir neben den in der Literatur bereits genannten Luteolin und Luteolin-7-glucosid die Chlorogensäure und einen orange-rot fluoreszierenden Fleck mit demselben R_f und der gleichen Farbe wie das Rutin. Auch bei Verwendung von BEW (4:1:2.2) als Fließmittel erhielten wir denselben R_f wie Rutin. Die Chromatographie der Hydrolyseprodukte auf Cellulose in 40%iger Essigsäure ergab nach Besprühen mit basischem Bleiacetat einen gelben und einen orangeroten, im Tageslicht sichtbaren Fleck, die durch Vergleich mit Testsubstanzen identisch mit Luteolin und Quercetin waren. Zum Nachweis des letzteren waren allerdings sehr hohe Konzentrationen nötig. Zum Identitätsbeweis des Rutins eluierten wir die entsprechende Zone aus der Platte und verglichen die UV-Spektren. Nach Hydrolyse waren Glucose und Rhamnose nachweisbar. Damit dürfte bewiesen sein, daß Folia Oleae auch Rutin enthalten.

Wie Abb. 8, S. 46, zeigt, findet sich bei dem für die Identitätsprüfung entscheidenden Chromatogramm im R_f -Bereich 0.37 das Rutin. Darüber liegen bei R_f 0.47 die Chlorogensäure und unmittelbar über einem unbekannten grün-türkisen Fleck bei R_f ca. 0.66 das Luteolin-7-glucosid. Es folgen zwei unbekannte grüngelbe und eine orangerote Zone und im R_f -Bereich von 0.91 die Isochlorogensäure. An der Lösungsmittelfront befindet sich das Luteolin.

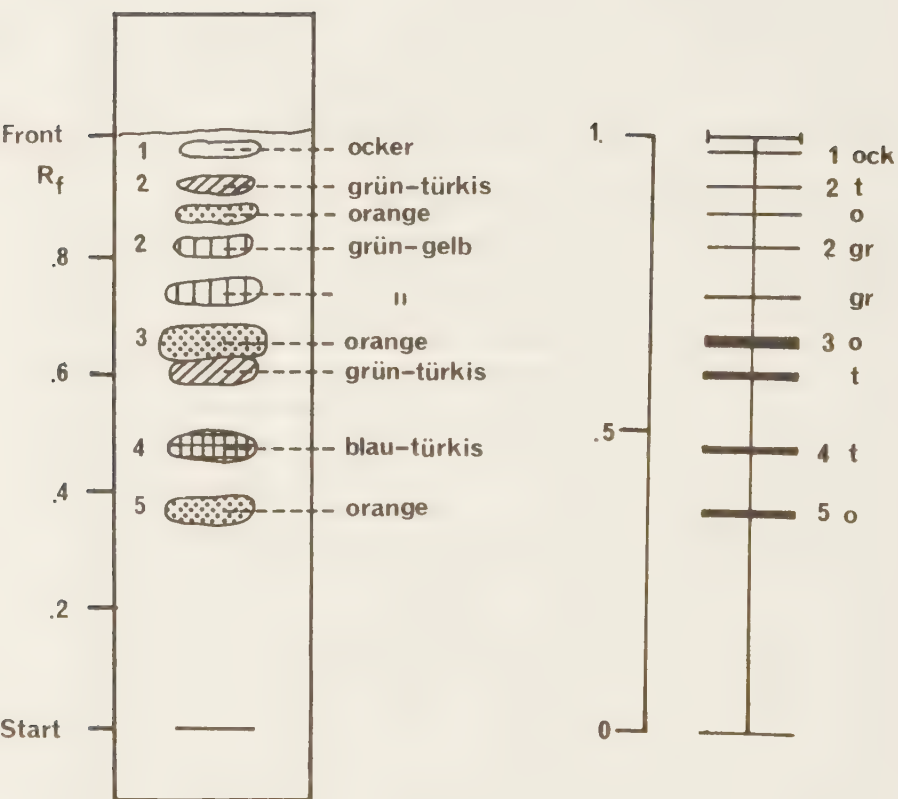


Abb. 8

DC eines äthanolischen Auszuges aus Folia Oleae auf Kieselgel
60 F₂₅₄ (Merck)

Fließmittel: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Sprühreagens: Naturstoffreagens + Polyäthylenglykol-Lösung

1 = Luteolin

2 = Isochlorogensäure

3 = Luteolin-7-O-glucosid

4 = Chlorogensäure

5 = Rutin

2. Quantitative Bestimmung des Oleuropeins in Olivenblatt-Extrakten

Zu Beginn unserer Arbeiten war nur eine Bestimmungsmethode für das Oleuropein von COHEN¹⁰⁸⁾ bekannt. Wie aber in einer späteren Veröffentlichung¹⁰⁹⁾ angegeben wird, bestimmt er mit dieser Methode nur ein "bitteres Prinzip", möglicherweise das Aglucon, aber nicht das Oleuropein. Auf diesen Wirkstoff ist seine Methode auch nicht anwendbar, da das Oleuropein wegen seinen beiden orthoständigen OH-Gruppen mit dem hinzugefügten Aluminiumoxid reagieren und in der abdekantierten überstehenden Lösung nicht mehr auffindbar sein würde.

Da das Oleuropein sein erstes Maximum bei 284 nm und ein sehr starkes Hauptmaximum bei 233 nm aufweist (s. Abb. 9, S. 48), versuchten wir zunächst eine spektralphotometrische UV-Absorptionsmessung. Wir wählten für unsere Bestimmungen das Maximum bei 284 nm aus. Aus mehreren Bestimmungen ergab sich für reines Oleuropein ein $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ von 562 und die mit 0.2 bis 1 mg Oleuropein aufgestellte Eichgerade verlief im angegebenen Konzentrationsbereich linear (s. Abb. 10, S. 48).

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Olivenblatt-Fluidextraktes für die anschließende spektralphotometrische UV-Absorptionsmessung erfolgte in dem genannten Laufmittelsystem Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3). Die UV-Absorptionskurve des auf der Platte markierten und aus ihr eluierten Oleuropeinflecks wies bei 316 nm ein zusätzliches Maximum auf, das nur von einer weiteren Substanz herrühren kann, die auf derselben Höhe wie das Oleuropein liegt. Damit sind die im Durchschnitt um 40% höheren Werte gegenüber der von uns unten beschriebenen Anthronmethode erklärbar. Ein Vergleich mehrerer Bestimmungen mittels der beiden Methoden ergab für den Fluid-Extrakt 2.0 - 2.07% nach der Anthronmethode gegenüber 3.36 - 3.48% nach der spektralphotometrischen Absorptionsmessung.

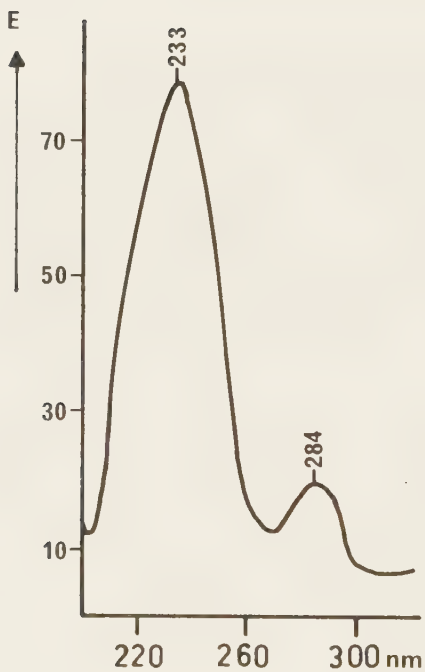


Abb. 9

UV-Spektrum des Oleuropeins in MeOH

EICHGERADE OLEUROPEIN
20-100 μ g/5ml bei 281 nm

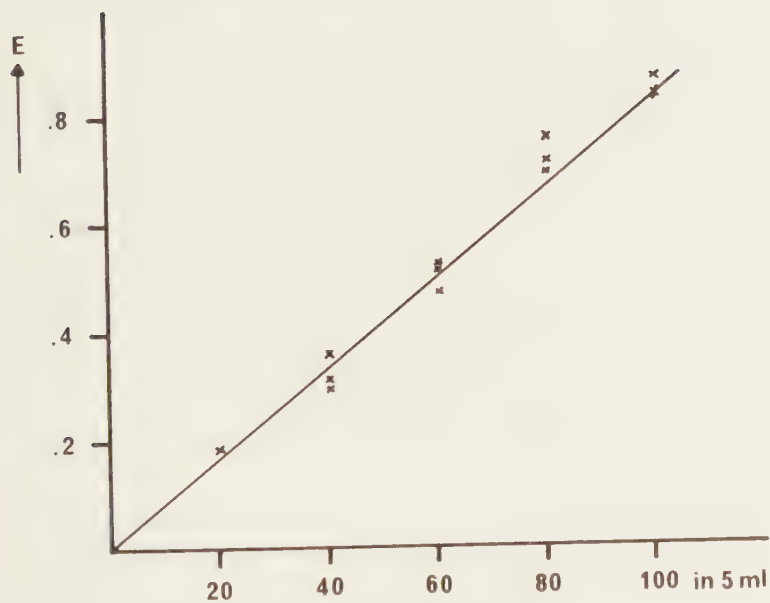


Abb. 10

Eichgerade Oleuropein

Die einfach durchzuführende UV-Messung war daher für eine exakte quantitative Bewertung der Folia Oleae und ihrer Zubereitungen nicht brauchbar. Es mußte nach einer anderen Bestimmungsmethode gesucht werden.

Da das Oleuropein ein Glykosid darstellt, bot sich die Bestimmung des Zuckeranteils im Molekül nach der Anthron-Methode von MALOV an. Bei jeder Versuchsreihe wurde gleichzeitig eine Bestimmung einer Glucoselösung durchgeführt, so daß sich für die Ermittlung des Glucosegehaltes das Aufstellen einer Eichgeraden erübrigte:

9.5 mg D(+)-Glucose wasserfrei (Merck Nr.8337), genau gewogen, werden in 100 ml H₂O gelöst; 2 ml davon werden auf 5 ml mit Wasser ergänzt und die Lösung wird denselben Bedingungen wie das mit 5 ml Methanol aus der Platte eluierte Oleuropein unterworfen. Dadurch werden die gleichen Reaktionsbedingungen für alle Proben gewährleistet.

Unsere Bestimmungen zeigten, daß sich ohne vorangegangene Hydrolyse mit H₂SO₄ (3n) die gleichen Werte ergaben, wie nach einer vorausgegangenen Hydrolyse. Die Zugabe des Anthron-H₂SO₄-Reagens genügt also bereits zur vollständigen Spaltung der Glucose-Bindung und es kann auf eine vorausgehende Hydrolyse des Oleuropeins verzichtet werden. Wir verlängerten aber die Erhitzungsdauer im siedenden Wasserbad nach der Zugabe des Reagens auf 5 Min. Eine weitere Verlängerung brachte praktisch keine Änderung der Werte. Allerdings war darauf zu achten, daß das Wasserbad während der gesamten Erhitzungsdauer am Sieden gehalten wurde.

Um die Exaktheit der Methode zu überprüfen, führten wir mehrere Oleuropeineinzelbestimmungen durch und verglichen diese mit den theoretisch errechneten. Der Glucosegehalt im Oleuropeinmolekül errechnet sich dabei nach der Formel

$$I \quad \frac{\text{Mol.Gew. Oleuropein}}{\text{Mol.Gew. Glucose}} = \frac{\mu\text{g Oleuropein}}{x}$$

$x = \mu\text{g Glucose im Oleuropein (theoretischer Wert)}$

Die Umrechnung der bei jeder Bestimmung ermittelten Extinktionen für den Oleuropein-Test und die Glucose auf den Gehalt an Glucose im Oleuropeinmolekül erfolgt nach der Formel:

$$\text{II} \quad \begin{array}{ccc} \text{Extinktion} & : & \text{Extinktion} \\ \text{Ol.Test} & & \text{Glucose} \end{array} = x : \mu\text{g Glucose}$$

$$x = \mu\text{g Glucose im Oleuropeinmolekül, bezogen auf den Blindversuch (gefundener Wert)}$$

Die Umrechnung des so ermittelten Glucosegehaltes auf den Gehalt des gesamten Moleküls Oleuropein erfolgt wiederum nach Formel I unter Bezug auf die Molekulargewichte von Glucose und Oleuropein. Dabei erhält man den Faktor $\frac{540.53}{180.16} = 3.00$, mit dem die ermittelten Glucosewerte zu multiplizieren sind, um den Gehalt an Oleuropein eines Extraktes zu erhalten.

Aus den folgenden Tabellen (siehe Tabelle 9, S. 52) ist ersichtlich, daß bei einem Einsatz von 0.4 mg Oleuropein der Verlust durch die Bestimmungsmethode gegenüber der eingesetzten Substanzmenge nur 2.67% beträgt. Von den theoretisch in der Probe enthaltenen 53.28 μg Glucose kann man 51.86 μg (gemittelter Wert von 5 Bestimmungen) in der Probe wiederfinden. Werden höhere Substanzmengen eingesetzt, so steigen auch die prozentualen Verlustmengen.

T a b e l l e 9

Mittelwerte der Glucosebestimmung von Oleuropein

Substanz	Einwaage	DC-Auflragung	vorhandene μg Glucosemenge in der Probe	theoretischer Wert μg	Verlust %
Glucose wasserfrei	9.27 mg	-	74.16	-	-
Oleuropein	50 mg/5 ml	400 μg	51.86	53.28	2.67
		600 μg	76.85	79.92	3.85
		800 μg	101.59	106.56	4.66
		1000 μg	127.28	133.20	4.44
Einzelbestimmungen					
Glucose					
Menge in der Probe μg	Extinktion	Oleuropein			
		400	600	800	1000
		Extinkt.	Menge in der Probe μg	E	M
				μg	μg
74.16	0.51	0.36	52.25	0.53	77.06
	0.49	0.35	52.97	0.50	75.67
	0.46	0.31	49.97	0.48	77.58
	0.5	0.35	51.91	0.52	77.12
	0.53	-	-	0.55	76.96
	0.54	0.38	52.19	0.56	76.91
Gemittelter Wert			51.86	76.85	101.59
					127.28

3. Wertbestimmung des Oleuropeins in der Droge und ihren Zubereitungen

Wir verwendeten zur Extraktion der Droge Äthanol, da in ihm das Oleuropein gut löslich ist. Wir extrahierten 4 Stdn. im Soxhlet-Apparat bis zur völligen Farblosigkeit des Äthanol. Um die beste Extraktionsmethode heraus zu finden, führten wir verschiedene Versuche durch. Die Methode sollte speziell für geringe Drogenmengen (wenige g) geeignet sein und eine optimale Extraktion des Oleuropeins aus der Droge gewährleisten. Es zeigte sich aber, daß z.B. eine Wirbelextraktion von 5 Min. mit Äthanol im Omnimixer (Fa. Sorvall, Newtown/USA) wesentlich geringere Ausbeuten lieferte als die 4stündige Extraktion des Drogenpulvers mit Äthanol im Soxhlet, d.h. hiermit war keine quantitative Extraktion des Wirkstoffes gewährleistet. Die Soxhlet-Extraktion ergab z.B. 5.73% Ausbeute, während die Wirbel-Extraktion nur 2.29% Ausbeute ergab.

Der äthanolische Drogenextrakt läßt sich aber, selbst nach Abtrennung des Chlorophylls, oft sehr schlecht chromatographieren, d.h., das Oleuropein trennt sich häufig nicht sehr scharf von den Verunreinigungen ab. Wir gingen in diesem Fall dazu über, diese dadurch abzutrennen, daß wir den zur Trockne eingeeengten, mit Wasser aufgenommenen Extrakt 20mal mit kleinen Portionen von auf dem Wasserbad erwärmten Äthylacetat ausschüttelten. Dieses wiederholte Ausschütteln in kleinen Portionen ist sehr wichtig, um das Oleuropein quantitativ in das Äthylacetat überzuführen. Chromatographisch war nach der 17. Ausschüttelung im stark eingeeengten Rückstand der Äthylacetatausschüttelung kein Oleuropein mehr nachweisbar.

Um diese zeitraubende Ausschüttelung zu umgehen, versuchten wir die Droge von Anfang an mit Äthylacetat zu extrahieren. Die Ausbeuten lagen jedoch im Schnitt um ca. 30% niedriger. Die Ausbeute an Oleuropein betrug 3.82% gegenüber 5.73% durch Äthanol-Extraktion.

Wir verfahren daher nach folgender Methode:

Das Drogenpulver (10 g) wird über 12 Stdn. einer Vorreinigung mit Petroläther im Soxhlet-Apparat unterworfen. Der Petrolätherextrakt wird verworfen. Dann extrahiert man, ebenfalls am Soxhlet, kontinuierlich über 4 Stdn. mit Äthanol, dampft das Lösungsmittel im Vakuum ab, nimmt den Trockenrückstand mit Wasser auf und digeriert auf dem siedenden Wasserbad 1 Stde., filtriert von dem ausgefallenen Chlorophyll ab und schüttelt, wie oben beschrieben, mit warmem Äthylacetat aus. Die vereinigten Äthylacetatausschüttelungen werden eingengt und auf 50 ml ergänzt.

Es wird vorgeschlagen, den Drogenauszug wie angegeben im Verhältnis 1:5 herzustellen, damit man auch bei Drogen mit geringer Wirkstoffkonzentration Extinktionen erhält, die im Bereich von 0.1 - 1.0 liegen. Von dieser Lösung werden aliquote Mengen auf eine Kieselgel-Fluoreszenzfolie (Fa. Macherey, Nagel u. Co.) aufgetragen und im System Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3) chromatographiert. Man markiert im langwelligen UV-Licht (254 nm) die Oleuropeinzone. Nach der Entnahme der Zone aus der Platte wird durch Zugabe von H_2O und 2minütigem Schütteln auf dem Whirlimixer das Oleuropein aus dem Kieselgel mit Wasser extrahiert und dann die Farbreaktion (Anthrone- H_2SO_4 -Reaktion) durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei 623 nm.

Bei der Untersuchung von Zubereitungen aus der Droge verfährt man genauso: Gelatinekapseln werden aufgeschnitten oder Draagees pulverisiert in die Extraktionshülse gegeben. Bei einem Fluidextrakt aus der Droge kann man auf die Extraktion mit Äthanol verzichten und ihn, wie oben beschrieben, nach dem Einengen zur Trockne und Aufnahme in Wasser mit auf dem Wasserbad angewärmten Äthylacetat ausschütteln. Beim Vergleich der theoretisch erwarteten Ergebnisse von reinem Oleuropein mit denen nach der DC differierten die Werte im Konzentrationsbereich 0.4 - 1 mg/ 5 ml um $\pm 3 - 5\%$ (siehe Tabelle 9, S. 52). Der quantitativen Auswertung von Bestimmungen aus der Droge und aus beliebigen galenischen Zubereitungen kann man folgende Berechnung zugrunde legen:

$$\% \text{ Oleuropein} = \frac{3 \cdot E_{w_{Gl}} \cdot Ex_a}{E_{w_d} \cdot Ex_{gl}}$$

$E_{w_{Gl}}$ = Einwaage Glucose wasserfrei in mg/100 ml

E_{w_d} = Einwaage der Droge in g/50 ml

Ex_a = gemessene Extinktion der Analyse bei 623 nm

Ex_{gl} = gemessene Extinktion des Glucose-Testes

Der Oleuropeingehalt einer Handelsdroge Folia Oleae berechnet sich bei 10.0 Drogenpulvereinwaage, einer 0.1 ml DC-Auftragung entsprechend einer Extinktion von 0.24 und einer Glucoselösung wasserfrei von 9.27 mg/100 ml mit der Extinktion von 0.5 wie

$$\% \text{ Oleuropein} = \frac{3 \cdot 9.27 \cdot 0.24}{10 \cdot 0.5}$$

$$\% \text{ Oleuropein} = \underline{1.3}$$

Die Handelsdroge enthält also 1.3% Oleuropein.

C. STABILISIERUNG DER ÖLBAUMBLÄTTERDROGE UND IHRER ZUBEREITUNGEN

Zur Frage der Stabilisierung der Ölbaumblätter und ihrer Zubereitungen existiert nur eine Arbeit. BALANSARD und DELPHAUT⁸³⁾ untersuchten 1952 den Wirkunterschied von frischer und getrockneter Droge. Dabei stellten sie fest, daß der Frischpflanzenauszug dem aus ein Jahr gelagerter Droge deutlich überlegen ist. Die gleiche Feststellung machten auch wir, als wir einen Äthanolauszug aus Olivenblättern des Handels mit dem aus frischen, in Spanien gesammelten, verglichen. Das chromatographische Bild der beiden Auszüge - auch das der flavonoiden Inhaltsstoffe - war zwar völlig identisch, doch differierte der Gehalt an Oleuropein um beinahe 75%.

	Einwaage g	Oleuropeingehalt %
Frische Droge	10.0 = 8.74 ^{*)}	6.1
Handelsdroge	10.0	1.3

Wir untersuchten nun zunächst den Einfluß der Trocknung auf den Oleuropeingehalt, indem wir die frisch gesammelten Blätter im Trockenschrank bei 40⁰, 60⁰ und 100⁰ dem Trocknungsprozeß unterwarfen. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

T a b e l l e 10

Trocknungstemperatur	Zeit Std.	Oleuropeingehalt %
Frische Blätter ^{*)}	-	6.1
40 ⁰	3	5.73
60 ⁰	2	4.45
100 ⁰	1	2.45

Es zeigte sich, daß bei einer Trocknung über 3 Std. bei 40⁰ kein bedeutender Wirkstoffverlust eingetreten war.

^{*)} Der Trocknungsverlust wurde nach DAB 7 bestimmt und betrug 12.61%.

Wir prüften auch den Einfluß von Luft, Stickstoff und Temperatur auf den Oleuropeingehalt in äthanolischen Extrakten aus Olivenblättern. Dabei zeigte sich, daß dieser bei 40°-Wärmeeinwirkung über 72 Stdn. um ca. 12%, bei 336stündiger Wärmeeinwirkung jedoch nur noch um weitere 0.8% abgenommen hatte. Die jeweiligen DC-Bilder zeigten praktisch keine Veränderungen gegenüber dem der Ausgangssubstanz. Bei Stehenlassen an Luft und Licht über einen Zeitraum von 2 Monaten verminderte sich der Gehalt dagegen um 50%. Derselbe äthanolische Blattextrakt, unter Stickstoffatmosphäre am Licht über denselben Zeitraum aufbewahrt, zeigte dagegen mit nur 16% einen wesentlich geringeren Wirkstoffverlust. Bei einem über 32 Tage unter Stickstoff aufbewahrten Spissum-Extrakt hatte der Oleuropeingehalt um ca. 20% abgenommen. In Tabelle 11 sind diese Ergebnisse zusammengestellt.

T a b e l l e 11

Untersuchungsmaterial	Oleuropeingehalt %
Extr.Fol.Oleae 1:5 mit Äthanol	
frisch bereitet	1.2
nach 2 Mon. an Luft und Licht	0.7
nach 2 Mon. unter Stickstoff	1.1
nach 72 Stdn. bei 40°	1.16
nach 336 Stdn. bei 40°	1.06
Extr.Fol.Oleae mit Äthanol 70%	0.44
Extr.spir.Spiss. aus dem Ausgangsextrakt nach 32d bezogen auf 100 ml	1.06

Wir untersuchten nun auch den Einfluß eines Stabilisierungsmittels auf den Oleuropeingehalt und wählten als Zusatz Sorbinsäure. Dabei zeigte sich aber nach einmonatiger Lagerung des Extraktes ein beinahe vollständiger Abbau des Oleuropeins.

Die Temperatur scheint demnach den Abbau nicht besonders zu beeinflussen. Bei Aufbewahrung eines Extraktes bei 40°C, der wie bereits gesagt, keinen wesentlichen Wirkstoffverlust erlitten hatte, konnten wir jedoch eine dunkelgelbe Verfärbung beobachten.

Besonders schnell laufen die Abbauprozesse im wässrigen Milieu ab. Bei einem mit 70%igem Äthanol hergestellten Extrakt war ein Wirkstoffverlust von ca. 66% zu beobachten. Dabei dürfte es unter Esteraseeinwirkung zur Hydrolyse des Esters und Freisetzung des Alkohols gekommen sein. Aus unseren Untersuchungen ergibt sich, daß ein äthanolischer, weitgehend wasserfrei hergestellter und unter Stickstoff aufbewahrter Extrakt am besten haltbar ist. Es dürfen vor allem die den Oleuropeinabbau beschleunigenden Säuren und Alkalien bei der galenischen Zubereitung möglichst wenig zur Wirkung kommen. Da das Oleuropein säure- und alkaliempfindlich ist, ist anzunehmen, daß das applizierte Glykosid im sauren Milieu des Magens bzw. im alkalischen des Darmes vor der Resorption verändert oder abgebaut wird, so daß es als eigentliche Wirkform nicht in Frage kommen dürfte.

Es interessierte daher, welchen Einfluß das pH auf eine mögliche Substanzveränderung ausübt. Wir führten einige Versuche mit reinen Oleuropeinlösungen und Auszügen durch, die mit genau eingestellten Pufferlösungen vom pH 1.1 - 2.4 - 3.5 - 7.0 - 9.1 - 10.1 - 11.6 versetzt und anschließend im Wasserbad bei 37° über 3 Stdn. geschüttelt wurden. Die Proben wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Erwartungsgemäß war im stark Sauren bei pH 1.1 und im stark Basischen bei pH 11.6 ein völliger Oleuropeinabbau eingetreten.

PETASITES MILL. UND TUSSILAGO FARFARA L.

A. EINLEITUNG

I. Arzneiliche Verwendung von Petasites-Arten

Die Pestwurz ist eine alte Heilpflanze. Schon Hippokrates, Dioskurides und Galen, später im Mittelalter Paracelsus und viele andere Autoren beschrieben sie und verordneten sie bei verschiedenen inneren Krankheiten, vor allem Husten und Asthma sowie bei Krampfständen der Leiborgane, als schweiß- und harntreibendes Mittel, Fiebermittel, Wurmmittel, zur Förderung der Menses. Die Blätter wurden äußerlich bei Geschwüren, Wunden und Hautkrankheiten verwendet. Sie findet sich in den Heilpflanzenbüchern der neueren Zeit 111,112,113). Erstmals wird von BUCHER 114) im Jahre 1951 in der Droge ein spasmolytisches Prinzip mit papaverinähnlicher Wirkung festgestellt. Nach BÜCHL 115,116,117) und STOLL 118,119) soll diese Wirkung dem von ihnen isolierten Petasin und Isopetasin zukommen. Auch von italienischen Autoren 120) wird auf die krampflösenden Eigenschaften hingewiesen, eine bemerkenswert schmerzstillende Wirkung wird gefunden. HÖRHAMMER und WAGNER 121) konnten experimentell die spasmolytischen Eigenschaften bestätigen. Spasmolytisch wirksam erwiesen sich die Sesquiterpene Petasin, Isopetasin und S-Petasin sowie die schwefelhaltigen Petasolester (siehe Seite 65).

Als Indikationen wurden für *Petasites officinalis* von KARL 122) angegeben:

1. Migräne, pectanginöse Beschwerden, Asthma
bronchiale
- und 2. Vegetative Regulationsstörungen.

Von DRUCKREY wurde in Neapel 1953 eine cytostatische Wirkung festgestellt.

II. Mikroskopische Identitäts- und Reinheitsprüfung

Die Blätter besitzen eine mehr oder minder kräftige Behaarung, die aus meist peitschenförmig geschlängelten Haaren neben großen geraden oder Gliederhaaren mit breiter Basalzelle, mehreren bis 10 dünnwandigen zylindrischen Zellen und einer stumpfkegelförmigen Endzelle besteht. Daneben finden sich Köpfchenhaare mit mehrzelligem Stiel und eiförmigem Köpfchen. Da bei manchen *Petasites*-Arten die einzelnen Haarformen denen von *Folia Farfarae* gleichen, ist ein sicheres Kriterium für die anatomische Unterscheidung nur die Zahl der Palisadenparenchymreihen. Während *Folia Farfarae* mehrere Schichten aufweist, zeigen *Petasites*-

blätter nur 1 - 2 Schichten. Das DAB 7 schreibt für Folia Farfarae deshalb vor, daß nur Blattstücke mit 3 - 4 Schichten vorkommen dürfen. Als weitere mikroskopische Unterscheidung nennt es die Anzahl der Spaltöffnungen. Die Blattoberseite von Petasites-Arten ist im Gegensatz zu Folia Farfarae verhältnismäßig arm an Stomata und zeigt nur eine schwache Kutikularstreifung (*Petasites paradoxus*) oder ist sogar spaltöffnungsfrei (*Petasites albus*). Die Herstellung einer größeren Anzahl von Blattquerschnitten oder von Oberflächenschnitten ist aber nur bei Vorliegen einer Ganzdroge möglich. Bei der Untersuchung des Drogenpulvers sind Stücke mit gut erkennbaren Palisadenschichten oder Oberflächensstücke selten anzutreffen und geringe Beimengungen zu Folia Farfarae sind daher kaum nachweisbar. Das ÖAB 9 läßt 3% Verunreinigungen zu. Im Drogenhandel sind Folia Petasites aber bisher nicht beobachtet worden.

III. Die in Europa vorkommenden Petasites-Arten

Für die neueren chemischen und pharmakologischen Untersuchungen wurde hauptsächlich die Droge *Petasites hybridus* (L.) G.M.SCH. (*P.officinalis* MOENCH) herangezogen.

In der Literatur werden als Verfälschung von Folia Farfarae außerdem die Blätter von *Petasites spurius* (RETZ) REHB. (auch *P.tomentosus*) genannt. An ihrer Stelle treten in Deutschland im alpinen und subalpinen Raum noch *P.paradoxus* (RETZ.) BAUMG. (*P.niveus* VILL. BAUMG.) auf. LAY¹²⁵) nennt zusätzlich auch noch *P.albus* (L.) GAERTNER, da eine ähnliche Blattform wie bei *Tussilago farfara* vorliegt und die Standorte beider Pflanzen sich häufig überschneiden. Nach den Blattformen kann man bei den Petasites-Arten zwei Gruppen unterscheiden:

- a) *Petasites*-Arten mit rundlich herzförmigen bis nierenförmigen Blättern und locker graufilziger Behaarung.
Petasites hybridus: Rhizom oben knollig verdickt. Grundständige Blätter am Ende der Blütezeit erscheinend, graufilzig behaart, im Alter besonders oberseits verkahlend und unterseits meist nur mit filzig behaarten Nerven, sehr groß werdend (bis 60 cm breit), etwa so lang wie breit, meist spitz, flachbuchtig gezähnt. Blattspreite am Grund abgerundete Lappen. Blattstiel (frisch) stumpfkantig, gerillt.

Petasites albus: Rhizom nicht knollig verdickt. Grundständige Blätter nach der Blüte erscheinend, unterseits bleibend graufilzig, mit fast kahlen Nerven, oberseits im Alter verkahlend bis 40 cm breit, breiter als lang, doppelt und flachbuchtig gezähnt, Blattspreite am Grund ohne Lappen, Blattstiel (frisch) seitlich abgeflacht, an den Seiten glatt.

- b) Petasites-Arten mit dreieckig-herzförmigen Blättern und unterseits dicht weißfilziger Behaarung.

Petasites paradoxus: Rhizom nach oben allmählich (nicht knollig) verdickt. Grundständige Blätter am Ende der Blütezeit erscheinend, oberseits graufilzig, später verkahlend, unterseits bleibend weißfilzig, mit weißfilzigen Nerven, bis 20 cm breit, so lang oder länger als breit, spitz buchtig und scharf gezähnt. Blattstiel (frisch) seitlich abgeflacht, an den Seiten glatt.

Petasites spurius: Blattspreite breiter als lang.

Tussilago farfara L.: ausdauernd, mit kriechendem Rhizom und langen unterirdischen Ausläufern. Grundständige Blätter erst nach der Blüte erscheinend, im Umriss herzförmig, groß, bis 20 cm lang, beiderseits dicht filzig behaart, oberseits später verkahlend, lederig, am Rand im Gegensatz zu Petasites buchtig eingeschnitten (bis etwa 9/10) und entfernt feingezähnt. 5 - 12 Hauptseitenerven, am Blattgrund einander fächerförmig genähert; Stiel seitlich abgeflacht, an den Seiten glatt.

Bastarde können zwischen allen Arten auftreten. In Gebieten, in denen 2 Arten zusammen vorkommen, sind sie gelegentlich aufzufinden. Dadurch erschwert sich eine Unterscheidung. Da außerdem die Blattformen dieser Bastarde meist nur noch schwach ausgeprägte Merkmale aufweisen, ist eine Verwechslung, vor allem bei der gepreßten Handelsdroge, leicht möglich.



IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Petasites Mill. (s. Übers. S. 65)

Im Jahre 1955 haben STOLL^{118,119)} und BÜCHI^{115,116,117)} unabhängig voneinander die chemische Bearbeitung der Inhaltsstoffe von Petasites hybridus aufgenommen. Sie isolierten die Sesquiterpene Petasin, Isopetasin, S-Petasin und S-Isopetasin, Ester des C₁₅-Alkohols Petasol bzw. Isopetasol mit Angelicasäure bzw. Methylmercaptoacrylsäure. Strukturell gehören diese in die Gruppe der Eremophilan-Sesquiterpene¹¹⁹⁾ Später isolierten NOVOTNY und Mitarb.¹²⁶⁻¹³¹⁾ aus Petasites hybridus Verbindungen eines anderen Terpen-Typs. Sie sind ebenfalls Derivate des Eremophilans, aber durch die Gegenwart eines Furanringes oder einer α,β -ungesättigten γ -Lactonkonfiguration charakterisiert.

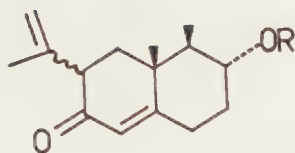
Der Unterschied zwischen den Inhaltsstoffen der in der Schweiz wachsenden Petasites hybridus und denjenigen, die aus Pflanzen tschechoslowakischer Herkunft gewonnen wurden, kann durch die Existenz zweier chemischer Rassen erklärt werden. Durch Untersuchungen einer großen Anzahl Petasites-hybridus-Pflanzen konnte nachgewiesen werden, daß tatsächlich Rassen existieren, die nur Furanderivate aufweisen, und solche, die diese auch nicht in Spuren enthalten.

An Sesquiterpenartigen Kohlenwasserstoffen wurden von oben genannten Autoren aus Petasites hybridus Petasiten, β -Elemen, α - und β -Humulen, Eremophilan¹³²⁾ und β - und 3-Bisabolen isoliert, sowie die sauerstoffhaltigen Substanzen vom Eremophilantyp: Furoeremophilan, Furoeremophilon, Furanopetasin¹³³⁾, Furano-petasol¹³³⁾ Eremophilenolid¹³⁴⁾, Petasitolid A und B, Dimethoxydihydrofuraneremophilan, 9-Hydroxyfuroeremophilan, daneben β -Sitosterol und Baurenol. Aus Petasites albus-Rhizomen isolierten die tschechischen Autoren^{135,136)} Petasalbin¹³⁷⁾, Albopetasin, Albopetasol, 6-Hydroxyeremophilenolid, 1-Undecen, Alben (Strukturaufklärung 1972 durch VOKAC und Mitarb.¹³⁸⁾, Petasiten, β -Elemen, Eremophilen, β - und γ -Bisabolen, Furanoeremophilan, Humulen, β -Sitosterol, Angelicajaponicin, Diangelyljaponicin, 2-Angelylfuroeremophilan.

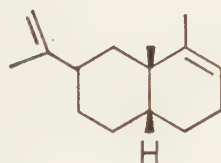
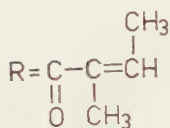
An Polyphenolen haben SCHWENDIMANN, TABACCHI und JACOT-GUILLARMOD¹³⁹⁾ aus *Petasites hybridus* und *albus* Astragalin und Isoquercitrin isoliert. Außerdem wurden in *Petasites hybridus* und *albus* Pflanzen aus dem Nordkaukasus¹⁴¹⁾ 6.2% Gerbstoff vom Pyrocatecholtyp, 7.1% Triterpensaponine, 0.6% Flavonoide unter anderen Quercetin, 2.8% org.Säuren, 7% Harz, 0.65% äther.Öl und Spuren von Alkaloiden gefunden. *Petasites spurius* enthält praktisch dieselben Substanzen wie *P.albus*¹²⁶⁾, nämlich Albopetasin, Petasalbin, Angelyljaponicin, Diangelyljaponicin.

Petasites paradoxus aus den Karpaten kann man als alpine Parallelpflanze zu *Petasites kablikianus* TAUSCH (BERCHT) bezeichnen¹⁴²⁾, da identische Inhaltsstoffe vorhanden sind, nämlich Kablicin, Eremophilen, Angelylfuroeremophilan, Angelyljaponicin und Diangelyljaponicin.

Formelübersicht

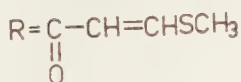


Petasin

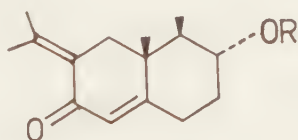


Eremophilen

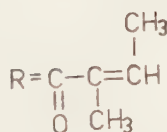
S-Petasin



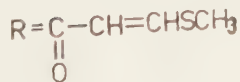
(Petasol)



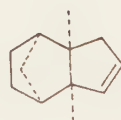
Isopetasin



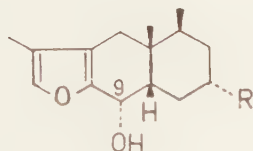
S-Isopetasin



(Isopetasol)



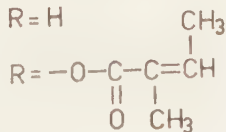
Alben

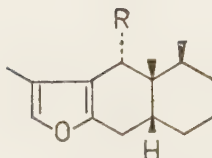


9-Hydroxyfuroeremophilan



Furanopetasin





Furanoeremophilan

$R = -H$

Furanoeremophilon

$R = =O$

Petasalbin

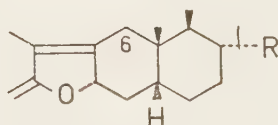
$R = \sim OH$

Albopetasin

$R = \sim O - C(=O) - C(CH_3)=CH_2$



6-Hydroxyeremophilenolid



Eremophilenolid

$R = H$

Petasitolid A

$R = O - C(=O) - C(CH_3)=CH_2$

Petasitolid B

$R = O - C(=O) - C(CH_3)_2=CH_2$

S-Petasitolid A cis

$R = O - C(=O) - CH=CHSCH_3$

S-Petasitolid B trans

B. ZUR ANALYTIK DER INHALTSSTOFFE

I. Bisherige Analysenmethoden

Folia Petasites fanden lange Zeit nur als Verfälschung von Folia Farfarae Beachtung. Man zeigte daher bis heute wenig Interesse an ihrer exakten analytischen Erfassung.

So liegen über den qualitativen Nachweis der Petasine nur einige Arbeiten vor. HÖRHAMMER, WAGNER und LAY¹⁴³⁾ haben eine dünnschichtchromatographische Methode ausgearbeitet, indem sie Petrolätherauszüge von Petasitesblättern auf Kieselgel-Platten in Chloroform p.A. (Kammersättigung) entwickelten. Nach Besprühen mit Anisaldehyd/Eisessig, Erhitzen auf 120° - 130° und nochmaligem Besprühen der heißen Platte mit konz. H_2SO_4 ist das Petasin bzw. Isopetasin im langwelligen UV-Licht bei 366 nm bei einem R_f von 0.35 - 0.45 als kräftig gelbrün fluoreszierender Fleck nachweisbar.

Eine weitere DC-Methode gaben NOVOTNY und Mitarb.¹³⁰⁾ an. Sie verwenden ebenfalls Kieselgelschichten und besprühen nach Entwicklung der Platten in Methylenchlorid mit konz. H_2SO_4 . Nach Erhitzen erschienen die "Petasine" mit roter oder grüner Farbe.

EFIMOVA und MURAV'EVA verwandten¹⁴⁰⁾ für die Identifizierung der Saponin- und Flavonoid-Fractionen die Papierchromatographie. Sie erhielten in BEW (6:1:3) 5 Saponinflecke und in BEW (4:1:5) 3 Flavonoidkomponenten, von denen sie eine als Quercetin identifizierten.

In den letzten Jahren gelangten immer mehr Präparate, die Petasites-Extrakte enthalten, auf den pharmazeutischen Markt und die Stoffliste *) nennt heute 5 Spezialitäten, in denen Extrakte von Petasites hybridus allein oder in Kombination mit anderen Drogen arzneilich verwendet werden.

Dies verlangt eine genaue Identifizierung und Bestimmung der pharmakologisch wichtigen Substanzen Petasin bzw. Isopetasin. Es fehlen ferner chemische Identitäts- und Rein-

*) Pharmazeutische Stoffliste, 4. Auflage, Werbe- u. Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker m.b.H., 6 Frankfurt/Main 7

heitsprüfungen für beide Drogen. Die bisherigen Unterscheidungsmöglichkeiten, insbesondere die bisherigen mikroskopischen Prüfungen des DAB 7 genügen nicht den praktischen Anforderungen. Es fehlen chromatographische Methoden, um die Identität eines Petasites-Auszuges festzustellen, besonders wenn "petasinfreie" Petasitesdrogen vorliegen. Vor allem sollen bereits geringe Mengen an Verfälschung und alle als Verfälschung in Frage kommenden Petasites-Arten erfaßt werden. Eine detaillierte und vergleichende Untersuchung über die Inhaltsstoffe in Blättern und Wurzeln der bei uns heimischen Petasites-Arten sowie der beiden chemischen Rassen existiert nicht. Außerdem fehlt eine quantitative Bestimmung der wertbestimmenden Substanzen in der Droge und deren Zubereitungen.

II. Eigene Untersuchungen

1. Verwendetes Drogenmaterial

Das für die Untersuchungen verwendete Pflanzenmaterial wurde von uns im Juli 1973 selbst gesammelt.

Die eindeutige Bestimmung der Pflanzenart erfolgte nach SCHMEILL-FITSCHEN¹²³⁾, HEGI und FLORA DER SCHWEIZ¹²⁴.

Zusätzlich haben wir die jeweiligen Standorte für die von uns gewünschten Arten bereits zeitig im Frühjahr ausgesucht, da die Bestimmung anhand der Blüten leichter möglich ist.

Standorte der gesammelten Drogen:

<u>Petasites hybridus</u>	München (Poschinger Weiher) Isartal
<u>Petasites albus</u>	Berwang (Bachrand)
<u>Petasites paradoxus</u>	München (Grosshesseloher Brücke) Isartal

Die beiden chemischen Rassen von Petasites hybridus ("Petasin"- und "Furan"-Rasse) standen uns bereits als Wurzel-Petroläther-Extrakte zur Verfügung.

<u>Tussilago farfara</u>	München (Biedersteinkanal)
--------------------------	----------------------------

2. Chromatographische Identitätsprüfung von Petasites-Arten und *Tussilago farfara*

a) Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Petasin bzw. Isopetasin und Unterscheidung der einzelnen Petasites-Arten

Bei *Petasites hybridus*, die der "Petasin-Rasse" angehört, ist ein Identitätsnachweis und eine Unterscheidung von *Folia Farfarae* durch Nachweis von Petasin bzw. Isopetasin eindeutig möglich. Wir verwendeten hierzu die bereits von LAY¹²⁵⁾ beschriebene Chromatographie der Petrolätherdrogenauszüge auf Kieselgel-Platten 60 F₂₅₄ in CHCl₃ bei Kammerfüllung und das von ihm genannte Sprühreagens, modifiziertes Kägi-Mischer-Reagens: Anisaldehyd/H₂SO₄ konz., mit dem Petasin und Isopetasin noch in starker Verdünnung im UV-Licht bei 366 nm eine starke, hellgrüne, über mehrere Tage anhaltende Fluoreszenz zeigen. Sie beruht wahrscheinlich auf einer Dehydrierung bzw. Dehydratisierung. Durch Vergleich der Dünnschichtchromatogramme der Petrolätherextrakte der verschiedenen bei uns heimischen Petasites-Arten sowie der beiden chemischen Rassen (s. Abb. 12, S. 69) kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

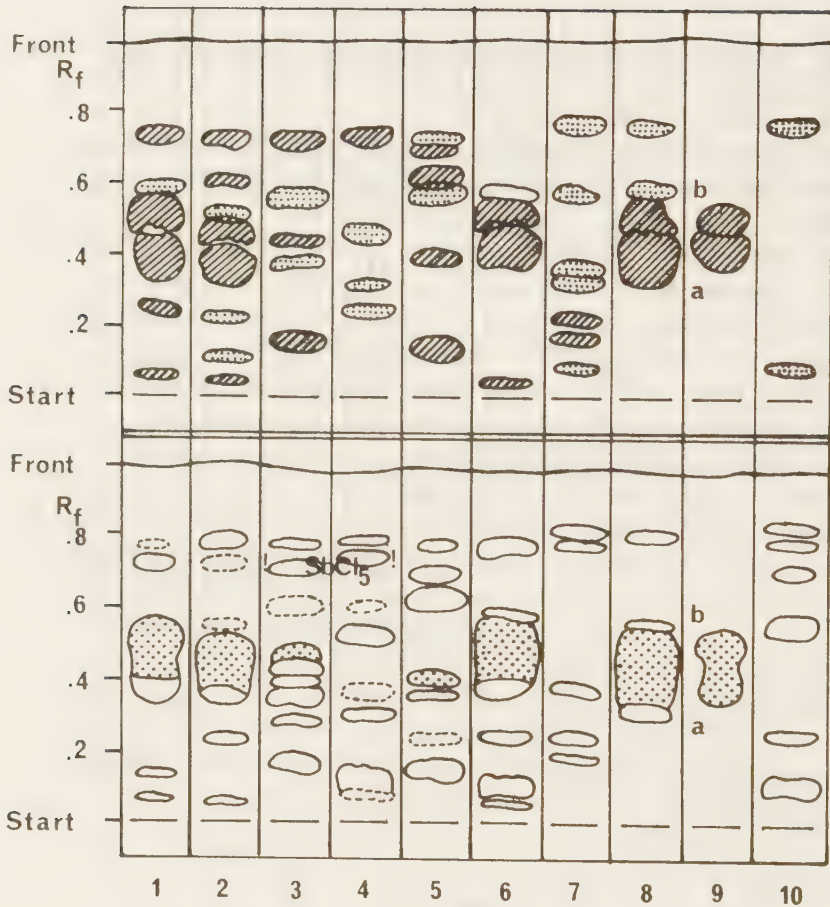


Abb. 12

Dünnschichtchromatogramme der Petrolätherauszüge der untersuchten Petasites-Arten und Folia Farfarae

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: Chloroform p.a. (Kammersättigung!)

Sprühreagens: Anisaldehyd-Eisessig (0.5:10) und H₂SO₄ konz.

- 1 = Petasites hybridus: Wurzelextrakt
- 2 = Petasites hybridus: Blattextrakt
- 3 = Petasites albus: Wurzelextrakt
- 4 = Petasites albus: Blattextrakt
- 5 = Petasites paradoxus: Wurzelextrakt
- 6 = Petasites paradoxus: Blattextrakt
- 7 = Petasites hybridus: Furanrasse
- 8 = Petasites hybridus: Petasinarasse
- 9 = Test: Petasin (a), Isopetasin (b)

10 = Folia Farfarae

A = unbesprüht:
gestrichelt UV 254 nm
gepunktet: UV 366 nm

B = nach dem Besprühen:
UV 366 nm (fluoreszierende Flecken gepunktet)

Wir fanden einen hohen Gehalt an Petasin bzw. Isopetasin in den Blättern und den Rhizomen von *P.hybridus*, in den Blättern von *P.paradoxus* sowie in der Petasinrasse und konnten damit frühere Untersuchungen bestätigen¹⁴³⁾. In sehr geringen Mengen sind diese beiden Substanzen auch in den Wurzeln von *P.paradoxus* vorhanden.

Im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen konnten wir in den Blättern von *P.albus* keinerlei Petasin nachweisen, wohl aber in den Wurzeln. Über das Vorkommen dieser Verbindungen in der Wurzel von *P.albus* wurde bisher noch nicht berichtet. Wir konnten jedoch eindeutig auf Grund der Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, dem Auftreten der Fluoreszenz nach dem Besprühen bei 366 nm und Vergleich mit der Testsubstanz Petasin nachweisen.

Bei der "Furanrasse" von *P.hybridus* konnten keine "Petasine" gefunden werden.

Unsere DC-Untersuchungen ergaben außerdem, daß es bei allen Arten sehr leicht möglich ist, zwischen Extrakten aus Wurzeln und Blättern zu unterscheiden (s.Abb. 12, S. 70).

Bei Betrachtung der unbesprühten Platte im langwelligen UV-Licht bei 366 nm zeigen die Wurzelextrakte eine charakteristische Blaufluoreszenz bei R_f 0.6, während diese Substanz in den Blättern fehlt. Möglicherweise stammt diese Blaufluoreszenz von einem Cumarinderivat.

In *Petasites albus* läßt sich an Stelle der "Petasine" das Albopetasin nachweisen, das mit Antimon-V-chlorid durch einen rötlichen Fleck bei R_f 0.7 - 0.85 auf dem DC nachgewiesen werden kann (s.Abb. 12). Die Reaktion mit Antimon-V-chlorid ist aber nicht charakteristisch genug, um sie als alleinige Unterscheidung des "Petasinfreien" Drogenmaterials von den *Folia Farfarae* zu verwenden. Außerdem ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen *P.hybridus* und *P.paradoxus* dünnschichtchromatographisch nicht möglich. Es galt deshalb, Methoden zu finden, die eine eindeutige Unterscheidung von Farfaradrogen und *Petasites*-Arten ermöglichen, wenn diese kein Petasin bzw. Isopetasin führen.

Für Petasin- bzw. Isopetasin-haltige Drogenmuster genügt die von LAY angegebene Methode, mit der er noch eine Verfälschung der Folia Farfarae mit 5 Gewichtsprozent Petasitesblättern einwandfrei nachweisen konnte.

b) Prüfung des Schleimgehaltes

Da es sich bei Folia Farfarae bekanntlich um eine schleimhaltige Droge handelt, Petasites aber keinen oder nur geringe Schleimmengen führt, versuchten wir eine Unterscheidung auf Grund der An- bzw. Abwesenheit des Schleimgehaltes zu treffen. Wir verwendeten dazu die von FRANZ¹⁴⁴⁾ angegebene Methode der Isolierung von Rohschleimen, der den in einem wässrigen Drogenextrakt enthaltenen Schleim durch Eingießen in Äthanol, dem ca. 1% Essigsäure zugefügt ist, ausfällt. Wir erhielten dabei bei Folia Farfarae 7.8% Rohschleim (bezogen auf die bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Droge), wogegen bei sämtlichen Petasites-Arten lediglich kaum wahrnehmbare bis leichte Trübungen auftraten. FRANZ¹⁴⁵⁾ gibt als Zusammensetzung des Farfara-Schleimes Glucose, Galaktose, Fructose, Arabinose, Xylose und Uronsäure an.

Wir haben diese Methode als Schnelltest ausgearbeitet: 1.0 g Drogenpulver werden mit 9.0 ml warmen Wasser (60-70°) versetzt und in einem Reagensglas 10 Min. mit Hilfe eines Whirlmixers extrahiert. Diese Warmwasserauszüge sind bei Folia Farfarae fast farblos, während sie bei Petasitesblättern eine hell- bis dunkelbraune Färbung aufzeigen. Sie werden in 20 ml 1% Essigsäure enthaltendes Äthanol 96% unter Rühren gegossen. Der Rohschleim fällt aus oder verursacht eine Trübung. Die weißen Trübungen werden untereinander verglichen.

Blattdroge	Trübung
1. Folia Farfarae	sehr stark bzw. Ausfällung
2. Folia Petasites hybridus	kaum wahrnehmbar
3. Folia Petasites paradoxus	leicht
4. Folia Petasites albus	-

Sollten die Trübungen etwas gefärbt sein, empfiehlt sich eine Umfällung durch Auflösen der abfiltrierten Schleime und Pektinstoffe in warmem Wasser und nochmaligem Eingießen in Äthanol.

Diese Methode stellt eine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit dar, wenn zwischen reiner Petasites- und Farfaradroge differenziert werden soll. Eine Verfälschung mit 20% Farfarablättern kann so noch durch eine Trübung festgestellt werden. Sie ist jedoch ungeeignet in Fällen, in denen die Farfaradroge nur mit geringen Mengen Petasites verfälscht ist.

c) Prüfung auf Petasites über den Nachweis der Sesquiterpene

Bei Verwendung von Kieselgelplatten mit Fluoreszenzzusatz zur Chromatographie lassen sich bei Petrolätherauszügen von Petasites-Arten im kurzwelligen UV-Licht bei 254 nm bei R_f 0.06; 0.27; 0.56; 0.74 und 0.87 Flecken mit Fluoreszenzminde- rung beobachten. Petrolätherauszüge von Folia Farfarae wiesen dagegen keine deutlichen Flecke mit Fluoreszenzminde- rungen auf (s. Abb. 12, S. 70).

Beimengungen von 5% Petasin- oder Furan-haltiger Drogen zu Folia Farfarae konnten dadurch noch gut nachgewiesen werden.

d) Versuche zur Identitätsprüfung von Petasitesblättern durch den DC-Nachweis der flavonoiden Inhaltsstoffe

Einen Hinweis, ob es sich bei Vorliegen von Pulverdroge bzw. von Extrakten um Folia Farfarae oder Folia Petasites handelt, liefert auch die Chromatographie der flavonoiden Inhaltsstoffe, wenn die Chromatogramme der methanolischen Auszüge mit Naturstoffreagens und Polyäthylenglykol-Lösung besprüht werden (siehe Abb. 13, S. 75 und Abb. 14, S. 76). Wie aus den Abbildungen ersichtlich, unterscheiden sich die einzelnen Petasites-Arten untereinander und von Folia Farfarae in einigen Flecken. Folia Farfarae-Chromatogramme (1) zeigen bei R_f 0.76 einen ockerfarbenen Fleck, der bei den Petasites-Arten fehlt. Bei Petasites-Chromatogrammen findet man über der Chlorogensäure einen grün-türkisen Fleck, der bei Folia Farfarae fehlt. P. paradoxus zeigt als einzige Art bei R_f 0.81 zwei orangefarbene

Flecke, die unmittelbar über und unter dem einen Fleck der Isochlorogensäure liegen. Die einzelnen Arten enthalten auch unterschiedliche Konzentrationen an Flavonon: *P.paradoxus* und *Fol.Farfarae* enthalten viel, *P.albus* und *P.hybridus* dagegen nur wenig Rutin. Die Konzentration von Astragalin und Isoquercitrin ist bei *P.paradoxus* am größten, bei *Folia Farfarae* ist Astragalin lediglich schwach sichtbar. Hierzu ist aber zu bemerken, daß geringe Abweichungen vom gegebenen DC-Bild bei verschiedener Herkunft des Pflanzenmaterials innerhalb der Gattung möglich ist. Die Zusammensetzung kann jahreszeitlich abhängig oder standortbedingt sein. Ca. 10% der von uns zu verschiedenen Jahreszeiten und an unterschiedlichen Standorten gesammelten Blätter fügen sich nicht lückenlos in dieses Schema ein. Deshalb kann diese Unterscheidungsmethode lediglich der Vororientierung dienen. Eine quantitative Bestimmung der Flavonoide mit der Hexamethylentetraminmethode, die an unserem Institut¹⁴⁶⁾ ausgearbeitet wurde, ergab für *Fol.Petasites hybridus* 1% und für *Folia Farfarae* 0.8% an flavonoiden Verbindungen, berechnet als Hyperosid. Sie ist deshalb ebenfalls nur bedingt zur Unterscheidung einsetzbar.

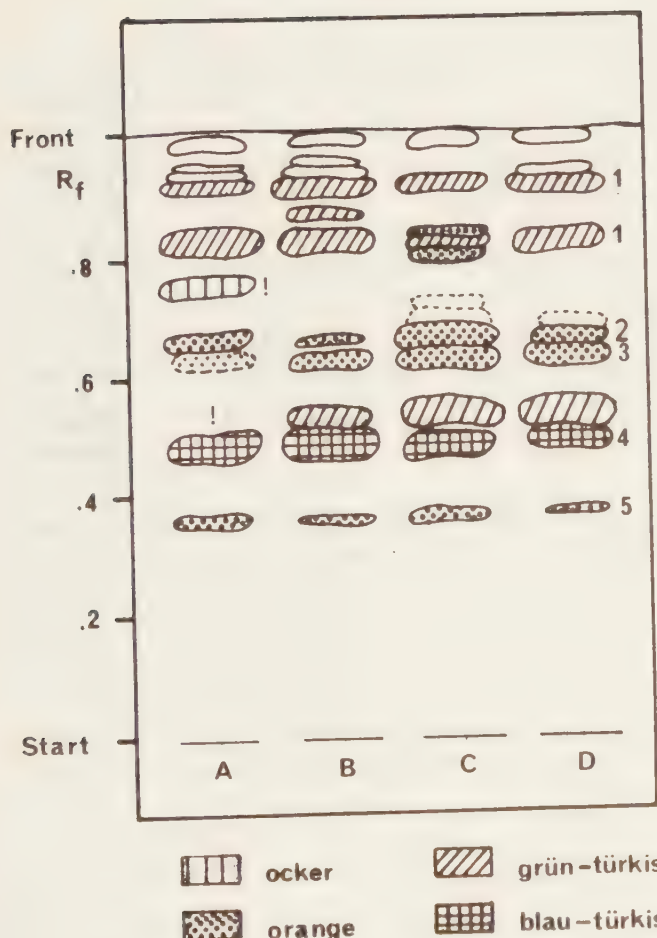


Abb. 13

DC von methanolischen Auszügen aus Folia Farfarae (A)
 Petasites albus (B)
 Petasites paradoxus (C)
 und Petasites hybridus (D)

auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Sprühreagens: Naturstoff-Reagens + Polyäthylenglykol-Lösung

1 = Isochlorogensäure
 2 = Isoquercitrin
 3 = Astragalin

4 = Chlorogensäure
 5 = Rutin

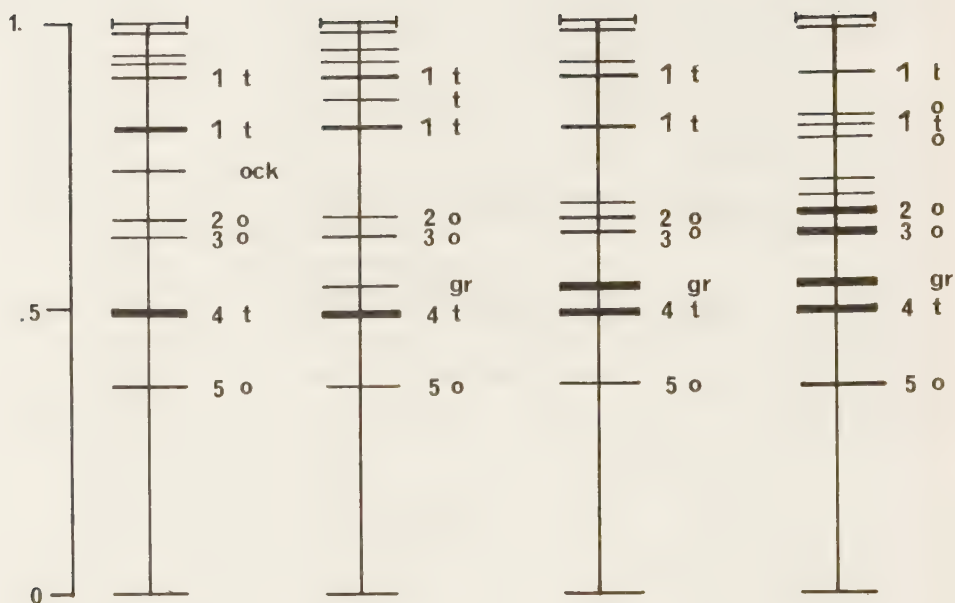


Abb. 14

Folia Farfarae

Petasites albus

Petasites hybridus

P. paradoxus

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Sprühreagens: Naturstoffreagens + Polyäthylenglykol-Lösung

1 = Isochlorogensäure

2 = Isoquercitrin

3 = Astragalin

4 = Chlorogensäure

5 = Rutin

ock = ocker

o = orange

t = türkis

gr = grün

e) Versuche zur gaschromatographischen Unterscheidung und Identitätsprüfung

Eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Petasites-Arten sollte mit Hilfe der Gaschromatographie möglich sein. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir Petrolätherextrakte, die wir zur Trockne eingeengt und in Methanol aufgenommen hatten. Wie einige Vorversuche zeigten, lassen sich die Petasine Furanopetasin, Petasin und Isopetasin gaschromatographisch nur schwer exakt trennen. Eine genügend gute Trennung von Petasin und Isopetasin erzielten wir aber auf der stationären Phase UCCW 982 (Methyl-vinyl-silicone-lastomer, Hewlett Packard, Böblingen/Stuttgart) bei programmiertem Betrieb.

In Abb. 15, S. 78, ist ein durch Temperaturprogrammierung erhaltenes Gaschromatogramm der in Frage kommenden Testsubstanzen wiedergegeben. Es zeigt, daß hiermit Petasin und Isopetasin gut trennbar sind. In Abb. 16, S. 79, sind die Gaschromatogramme der Petrolätherauszüge der von uns untersuchten Petasites-Arten und Farfara zusammengefaßt. Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte durch Überspritzen mit authentischen Substanzen.

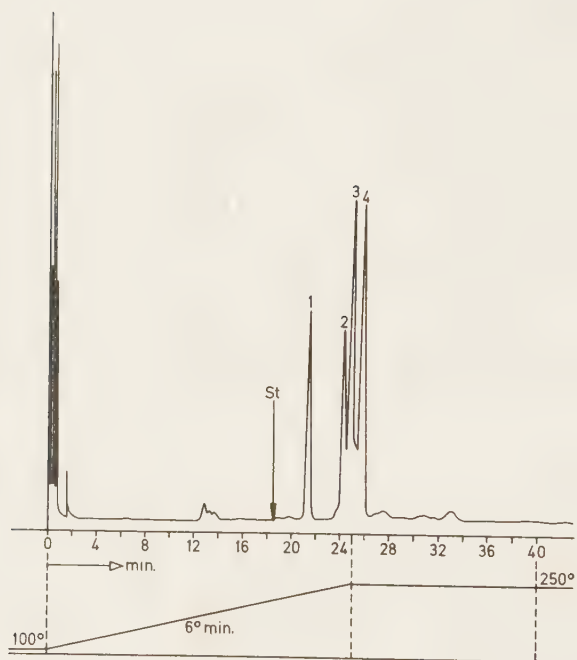


Abb. 15

Gaschromatogramm der wichtigsten Inhaltsstoffe der Petasites-Arten

- 1 = Albopetasin
- 2 = Furanopetasin
- 3 = Petasin
- 4 = Isopetasin
- St = Palmitinsäuremethylester (Standard)

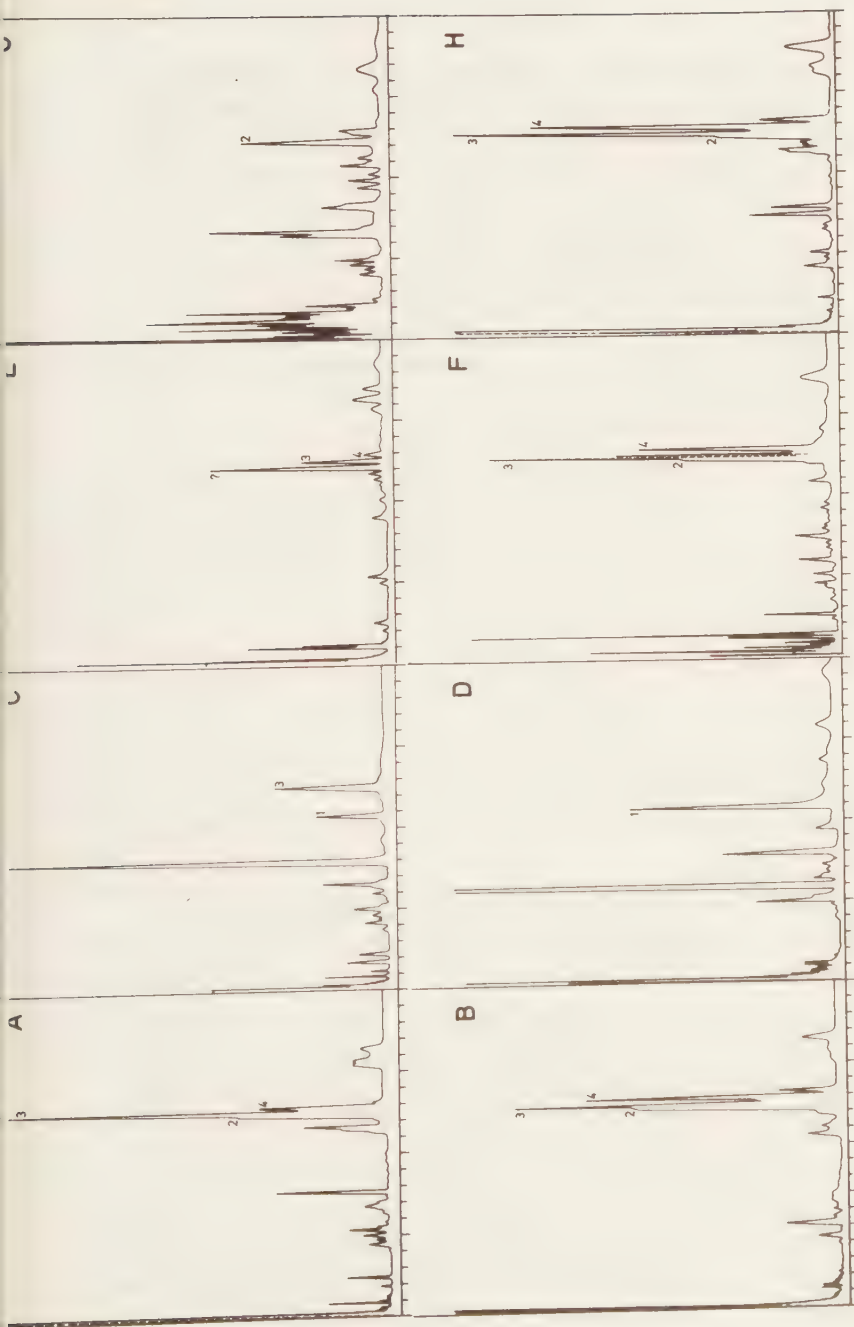


Abb. 16

Gaschromatogramme der Petrolätherextrakte der untersuchten Petasites-Arten
Erklärung siehe Seite 80

Erklärung zu Abb. 16 - Gaschromatogramm der Petroläther-
extrakte der untersuchten Petasites-
Arten

A = Petasites hybridus:	Wurzelextrakt
B = Petasites hybridus:	Blattextrakt
C = Petasites albus:	Wurzelextrakt
D = Petasites albus:	Blattextrakt
E = Petasites paradoxus:	Wurzelextrakt
F = Petasites paradoxus:	Blattextrakt
G = Petasites hybridus:	Furanrasse
H = Petasites hybridus:	Petasinrasse

1 = Albopetasin

2 = Furanopetasin

2 = Petasin

4 = Isopetasin

Das qualitative gaschromatographische Ergebnis bestätigt die Dünnschichtchromatographie.

Petasin und Isopetasin neben Furanopetasin in großer Menge nachweisbar in:

1. den Blättern und Wurzeln von Petasites hybridus und in den Blättern von Petasites paradoxus (siehe Abb. 12, S. 70 und Abb. 16, S. 79).
2. in den Blättern von Petasites albus waren diese Substanzen nicht nachweisbar (s. Abb. 12, S. 70 u. Abb. 16, S. 79). In den Wurzeln von Petasites albus dagegen zeigte sich deutlich der Petasinpeak (s. Abb. 16).
3. Die beiden "chemischen Rassen" von Petasites hybridus unterscheiden sich deutlich.
Während bei der Furanrasse nur Furanopetasin nachgewiesen werden konnte, fanden sich in der Petasinrasse große Mengen an Petasin und Isopetasin.

Im Gegensatz zu den bei der Dünnschichtchromatographie besprochenen Ergebnissen konnte gaschromatographisch bei der Petasinrasse von *Petasites hybridus* eindeutig ein geringer Gehalt an Furanopetasin nachgewiesen werden. Diese Petasinrasse war also nicht völlig frei von Furankörpern.

Bei allen Arten, welche Petasin und Isopetasin enthielten, überwog das Petasin gegenüber dem Isopetasin.

In Tabelle 12 sind die gaschromatographischen Ergebnisse zusammengefaßt.

T a b e l l e 12

	Albopetasin	Furanopetasin	Petasin	Isopetasin
<u>Petasites hybridus</u>				
Blatt	-	+	++	+
Wurzel	-	+	++	+
<u>Petasites albus</u>				
Blatt	+	-	-	-
Wurzel	+	-	+	-
<u>Petasites parad.</u>				
Blatt	-	+	++	-
Wurzel	-	-	(+)	(+)
<u>Petasites hybridus</u>				
Furanrasse	-	+	-	-
Petasinrasse	-	+	++	+

- = nicht nachweisbar
 (+) = noch nachweisbar
 + = gut nachweisbar
 ++ = sehr gut nachweisbar

3. Wertbestimmung der Petasites-Droge über die quantitative Bestimmung der "Petasine"

a) Direkte Spektralphotometrie von Petasin und Isopetasin

Da die Petasine charakteristische UV-Absorptionsspektren aufweisen, war es naheliegend, diese für eine quantitative Bestimmung heranzuziehen. Von den Arbeiten von AEBI und Mitarb.¹¹⁵⁾ sind die UV-Maxima und ϵ -Werte sowohl von Isopetasin als auch von Petasin bekannt.

Isopetasin besitzt im Wellenlängenbereich unter 300 nm ein Maximum bei 278 nm mit einem ϵ -Wert von 7870 und ein zweites Maximum bei 240 nm mit einem ϵ -Wert von 14940, während Petasin nur ein Maximum bei 230 nm ($\epsilon = 21500$), im Bereich von 278 nm aber keine Absorption aufweist.

Diese Unterschiede lassen demnach eine Gesamtbestimmung der beiden Petasine unter Bezug auf eine der beiden Verbindungen nicht zu.

Eine Bestimmung wäre daher nur durchführbar

- α. durch Einzelbestimmung der beiden Petasine nach ihrer chromatographischen Trennung oder
- β. durch Messung der Petasingemisch-Lösung bei zwei verschiedenen Wellenlängen, wobei eine Bestimmung ohne Kompensation unter Umständen nur für Isopetasin erreichbar sein könnte.

Zur Prüfung dieser Möglichkeiten bestimmten wir die UV-Absorptionskurven von Petasin, Isopetasin und eines Gemisches (1:1) beider Verbindungen (s.Abb. 17, S.82b).

Für die Aufstellung der Eichgeraden konnten wir uns nur auf Isopetasin als Referenzsubstanz beziehen, da allein diese Substanz mit der nötigen Reinheit zur Verfügung stand. Das uns freundlicherweise von Professor Dr. Herout überlassene Petasin erwies sich nach dem ϵ -Wert bei 230 nm und nach dem Gaschromatogramm nur zu etwa 65% rein.

Wir verwendeten eine 0.1%ige Stammlösung von Isopetasin in Methanol, von der wir 0.05, 0.075 und 0.1 ml in 5 ml-Meßküßchen mit Methanol bis zur Marke auffüllten und die Ex-

tinktionen der Lösungen bei 278 nm und 240 nm im Spektral-
photometer gegen reines Methanol als Blindwert maßen. Um
die Exaktheit der Bestimmungsmethode zu überprüfen, führten
wir für jeweils 15 Werte bei beiden Wellenlängen einer Iso-
petasinbestimmung eine Fehlerrechnung für den Quotienten

$$m = \frac{\text{Extinktion}}{\text{mg Substanz}}$$

durch.

T a b e l l e 13
Stammlösung: 5 mg Isopetasin / 5 ml Methanol

Wellen- länge nm	0.05 mg			0.075 mg			0.1 mg	
	E_x	=	m	E_y	=	m	E_z	= m
278	0.19		3.8	0.3		4.0	0.385	3.85
	0.21		4.2	0.32		4.266	0.4	4.0
	0.195		3.9	0.285		3.8	0.4	4.0
	0.185		3.7	0.295		3.933	0.37	3.7
	0.21		4.2	0.31		4.133	0.43	4.3
240	0.385		7.7	0.62		8.266	0.77	7.7
	0.43		8.6	0.64		8.533	0.8	8.0
	0.395		7.9	0.57		7.6	0.8	8.0
	0.375		7.5	0.57		7.6	0.74	7.4
	0.415		8.3	0.62		8.3	0.84	8.4

Daraus ergaben sich für Isopetasin

als Mittelwert: $\bar{m} = 3.985$ (7.95993)

als Standardabweichung $s = \frac{(\bar{m} - m^2)}{(n - 1)} : 0.19855$ (0.39487)

als Variabilitätskoeffizient $v\% = \frac{s \cdot 100}{\bar{m}} : 4.98\%$ (4.96%)

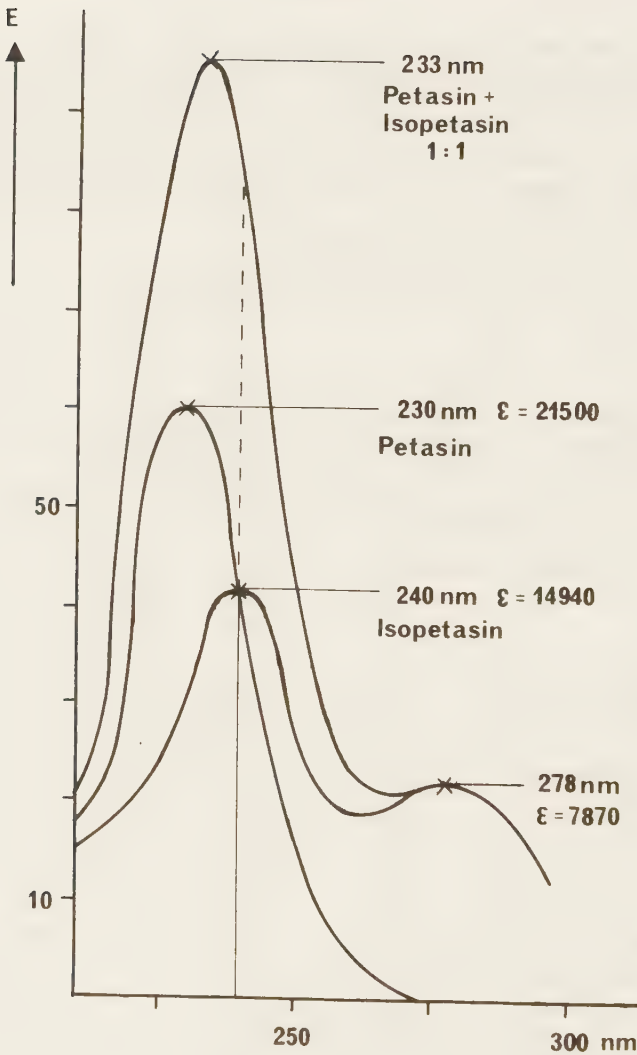


Abb. 17

UV-Absorptionsspektren von Petasin, Isopetasin und Überlagerungsspektrum eines Gemisches (1:1) beider Verbindungen

Ergebnis:

1. Die UV-Spektren von Petasin und Isopetasin stimmen im Kurvenverlauf und auch in den ϵ -Werten mit den Angaben der Literatur überein.
2. Eine Mischung beider Verbindungen liefert ein Überlagerungsspektrum mit seinem kurzwelligen Maximum bei 233 nm (s. Abb. 17, S. 82b). Daher ist eine gemeinsame Bestimmung von Isopetasin und Petasin durch Messung bei den Wellenlängen 240 und 230 nm nicht möglich.
3. Da allein Isopetasin bei 278 nm ein meßbares Maximum besitzt, wird bei einer Extinktionsmessung bei dieser Wellenlänge nur diese Verbindung erfaßt und ist somit auch im Gemisch Isopetasin/Petasin selektiv bestimmbar. Die für Isopetasin aufgestellten Eichgeraden bei beiden Wellenlängen genügen, wie aus Tab. 13 und Abb. 18 ersichtlich ist, den praktischen Anforderungen.

Petasin läßt sich möglicherweise über den ϵ -Wert bei 230 nm unter Abzug des ermittelten Isopetasingehaltes berechnen. Eine Überprüfung dieser Behauptung konnte aber nicht durchgeführt werden, da uns kein Petasin in genügender Reinheit als Kontrollsubstanz zur Verfügung stand.
4. Eine Gesamtbestimmung von Isopetasin und Petasin über eine Messung bei 240 nm unter alleinigem Bezug auf Isopetasin als Vergleichssubstanz ist bedingt möglich, da bei 240 nm das Petasin nur noch in der Flanke erfaßt wird und daher der ϵ -Wert des Petasins mit dem ϵ -Wert des Isopetasins in seinem Maximum in etwa übereinstimmt (s. Abb. 17, S. 82b).

Damit ist eine quantitative Bestimmung des Petasins bei dieser Wellenlänge unter Bezug auf Isopetasin als Testsubstanz und Abzug des für Isopetasin bei 278 nm ermittelten Gehaltes auch ohne Korrekturfaktor möglich.
5. Wie ein Vergleich der Ergebnisse der Direktbestimmung von reinem Isopetasin mit denen nach der DC und Elution aus dem Kieselgel ergab, ist ein Korrekturfaktor nicht notwendig, da die Werte im angegebenen Konzentrationsbereich von 0.05 bis 0.1 mg/ml um nur 5 - 12% differieren.

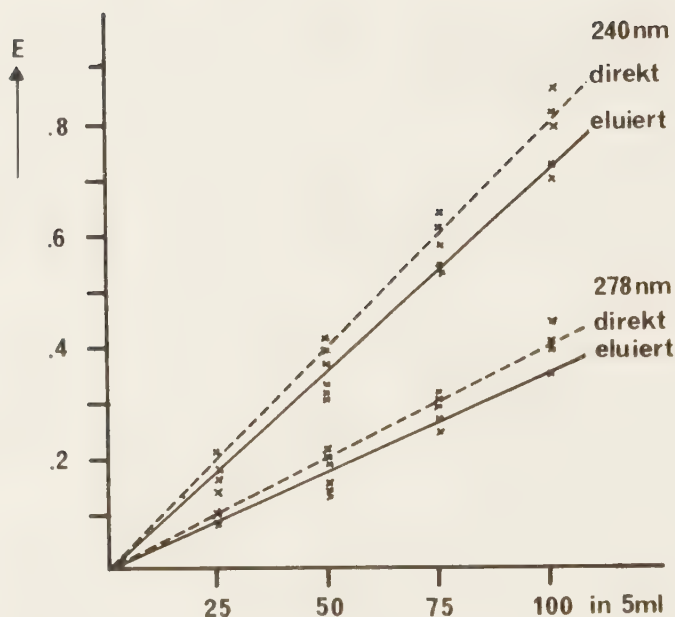


Abb. 18

Eichgerade Isopetasin 25 - 100 $\mu\text{g}/5$ ml Methanol bei 240 und 278 nm

- a.) Direkte photometrische Messung -----
 b.) nach Elution vom Kieselgel _____

Durch die Doppelmessung der Extinktionen bei 278 und 240 nm direkt oder nach Elution vom Kieselgel müßte demnach selektiv zuerst der Isopetasingehalt und dann der Gesamtgehalt an "Petasinen" ermittelt werden können. Aus beiden Werten müßte sich dann durch Kompensation oder auch über seinen ϵ -Wert das Petasin errechnen lassen.

b) Bestimmung des "Petasin"-Gemisches in der Droge und deren Zubereitungen

Zur Bestimmung der "Petasine" in der Droge oder in entsprechenden galenischen Zubereitungen versuchten wir zunächst die bereits oben beschriebene Methode der dünnschichtchromatographischen Abtrennung des Petasins und Isopetasins mit anschließender photometrischer Bestimmung.

Da die beiden Substanzen Petasin und Isopetasin dünnschichtchromatographisch auch in verschiedenen Fließmitteln nicht deutlich voneinander getrennt werden konnten, mußten beide Substanzen gemeinsam der Platte entnommen und gemeinsam bestimmt werden.

Wir trugen verschiedene Konzentrationen eines Petrolätherauszuges der Droge, den wir in einem 5 ml Meßkölbchen bei 20° mit Methanol p.A. bis zur Marke aufgefüllt hatten, auf eine Kieselgelfertigplatte 60 F₂₅₄ auf und entwickelten bei Kammersättigung in CHCl₃ p.A.. Es erschienen unter dem UV-Licht bei 254 nm im mittleren R_f-Bereich zwei dicht übereinanderliegende, fluoreszenzmindernde Flecke, bei denen es sich nach den mitchromatographierten Testsubstanzen um Petasin und Isopetasin handelte. Sie wurden unter dem UV-Licht markiert, zusammen der Platte entnommen und mit 5 ml Methanol extrahiert.

Aus dem Ergebnisvergleich der photometrischen und der gaschromatographischen Bestimmung (s.Seite 86/88) sowie einer Reihe von dünnschichtchromatographischen Untersuchungen ergab sich folgendes:

1. Die photometrische Bestimmung des Isopetasins durch Extinktionsmessung bei 278 nm lieferte gegenüber der Gaschromatographie stark überhöhte, d.h. zum Teil doppelt so hohe Werte.
2. Die Gehaltsbestimmung des Petasins durch Extinktionsmessung bei 240 nm und Subtraktion des Isopetasingehaltes zeigte gegenüber der Gaschromatographie vergleichbare Werte. Allerdings erwies sich diese Methode nicht immer als voll reproduzierbar.

Diskussion der Diskrepanz von photometrischer und gaschromato-
graphischer Bestimmung:

Bei der Aufnahme der "Petasin"-UV-Spektren aus verschiedenen Extrakten zeigte sich, daß im Vergleich zum Petasin/Isopetasin-Überlagerungsspektrum (s.Abb. 17, S.82b) die Maxima bei 278 nm etwas zu höheren, die bei 233 nm zu etwas tieferen Wellenlängen hin verschoben waren (s.Abb. 19). Diese Verschiebung allein könnte durch eine pH-Änderung oder durch eine Substanz bedingt sein, die unter einem der beiden Flecke liegt und in dem genannten Wellenbereich absorbiert. Die gemessenen "überhöhten" Extinktionen wären damit nur mit dem Vorliegen einer zweiten Substanz erklärbar.

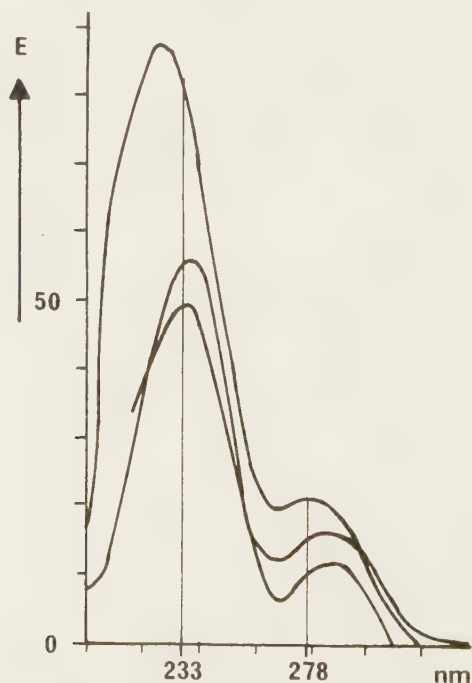


Abb. 19

Da der Petasingehalt, der photometrisch aus der Differenz: "Gesamtpetasine" - Isopetasin bei 240 nm erhalten wurde, mit dem gaschromatographisch ermittelten Gehalt vergleichbar ist, müssen die Substanz oder die Substanzen ein mit Isopetasin identisches oder nahezu identisches UV-Spektrum besitzen.

Da es nicht gelang, diese Begleitsubstanzen abzutrennen bzw. zu identifizieren, mußte die photometrische Bestimmung der "Petasine" aus Drogenextrakten zunächst als nicht durchführbar aufgegeben werden.

4. Quantitative gaschromatographische Bestimmung

Wie zahlreiche Versuche ergaben, macht die gaschromatographische Trennung von Petasin und Isopetasin und die exakte Abtrennung dieser beiden Substanzen von den Begleitstoffen keine Schwierigkeiten. Unter den auf Seite 77 beschriebenen apparativen Bedingungen gelang eine Trennung sehr gut. Die quantitative Bestimmung dieser wertbestimmenden Inhaltsstoffe wurde nach der Methode des inneren Standards, die auch in der Ph.Eur.II (1971) als analytische Methode verwendet wird, durchgeführt.

Als inneren Standard (Bezugssubstanz) verwendeten wir Palmitinsäuremethylester, der sich mit keinem Peak im Petasites-Gaschromatogramm überlappte (siehe Abbildung 15, S. 78).

a) Bestimmung der Korrekturfaktoren

Um die Detektorempfindlichkeit für die einzelnen Substanzen und damit die Korrekturfaktoren in Bezug auf den Palmitinsäuremethylester festzustellen, wurden genau gewogene Mengen Isopetasin und Palmitinsäuremethylester im Gaschromatographen mehrmals in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Aus den Peakflächen errechnet sich dann der Korrekturfaktor f nach:

$$f = \frac{\text{Menge Standard} \cdot \text{Fläche Isopetasin}}{\text{Menge Isopetasin} \cdot \text{Fläche Standard}}$$

Da uns für die Bestimmung des Korrekturfaktors in Bezug auf die Standardsubstanz Palmitinsäuremethylester nur Isopetasin in genügender Menge und Reinheit zur Verfügung stand (s.S.82), mußte der Korrekturfaktor für Petasin, das im Gaschromatographen getrennt vom Isopetasin bestimmt wird, gleich dem für Isopetasin angenommen werden.

Da beide Substanzen sich nur in der Lage einer Doppelbindung unterscheiden (siehe Formelübersicht S. 65), ist bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors auch kein gravierender Unterschied in der Detektorempfindlichkeit der beiden Substanzen zu erwarten.

Korrekturfaktor f: Petasin/Isopetasin (FID) 0.7

b) Gaschromatographische Bestimmung von Petasin und Isopetasin in der Droge und ihren galenischen Zubereitungen

Zur Herstellung der Analysenlösung wurden ca. 100 mg Handels-extrakt (genau gewogen) bzw. der Trockenrückstand des Petrol-ätherauszugs aus ca. 10 g Droge (genau gewogen) mit ca. 10 mg Standard (genau gewogen) versetzt und diese Mischung in ca. 3 ml Methanol p.A. gelöst.

Apparative Bedingungen: Siehe Seite 77.

Einspritzmenge: 3 - 4 µl (entsprechend ca. 100 - 120 µg
Extrakt bzw. 10 - 15 mg Droge)

Relative Retentionszeiten: Petasin 1.35

Isopetasin 1.40

Die Berechnung erfolgt dann nach folgender Formel:

% Petasin/Isopetasin =

$$\frac{\text{Fläche Petasin/Isopetasin} \cdot \text{Menge Standard} \cdot 100}{\text{Fläche Standard} \cdot f \cdot \text{Einw. Extr. bzw. Droge in mg}}$$

Mit dieser Formel berechnet sich der Petasin- und Isopetasin-gehalt in den bereits bei den photometrischen Bestimmungs-versuchen verwendeten Handelsextrakten wie folgt:

Fluid-Extrakt

<u>Analysenlösung:</u>	Extrakt	126.2 mg
	Standard	11.7 mg
	Methanol p.A. ca.	3 ml

Petasin: 3.1% Isopetasin: 4.3% (Mittelwert aus mehreren Bestimmungen)

Dieser Fluidextrakt des Handels enthält demnach 3.1% Petasin und 4.3% Isopetasin, zusammen somit 7.4% "Petasine".

Spissum-Extrakt

<u>Analysenlösung:</u>	Extrakt	109.7 mg
	Standard	12.2 mg
	Methanol p.A. ca.	3 ml

Petasin: 4.0% Isopetasin: 7.5% (Mittelwert aus mehreren Bestimmungen)

Dieser Spissum-Extrakt enthält somit 4.0% Petasin und 7.5% Isopetasin, zusammen demnach 11.5% "Petasine".

Vergleich: Dünnschichtchromatographie - Gaschromatographie

		Isopetasin (278 nm)	Petasin (240 nm)	"Gesamtpetasine" (240 nm)
Fluid- Extrakt	DC	10.2%	2.8%	13.0%
	GC	4.3%	3.1%	7.4%

		I	II	I	II	I	II
Spissum- Extrakt	DC	9.7%	9.7%	4.6%	6.8%	14.3%	16.5%
	GC	7.5%		4.0%		11.5%	

I und II: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der DC-Abtrennung (siehe oben).

Wie die Gegenüberstellung deutlich zeigt, differieren die photometrisch erhaltenen Werte aus den oben angeführten

Gründen erheblich von denen der Gaschromatographie. Die quantitative gaschromatographische Bestimmungsmethode eignet sich sehr gut, da sie sich durch sehr gute Reproduzierbarkeit, hohe Genauigkeit und große Zeitersparnis auszeichnet.

5. Untersuchung der "S-Petasine"

Bei der Überlegung, welche Verbindung dünnschichtchromatographisch unter dem Petasin bzw. Isopetasinfleck liegen und einen überhöhten Gehalt bedingen könnten, fiel der Verdacht auf die schwefelhaltigen Verbindungen S-Petasin und S-Isopetasin, die praktisch das gleiche chromophore System enthalten (siehe Formelübersicht S. 65).

Diese Vermutung bestärkte sich, als wir nach Elution des "Petasinflecks" vom Kieselgel in dem erhaltenen Substanzrückstand Schwefel nachweisen konnten. Dieser Nachweis erfolgte:

- a) Nach Oxidation mit H_2O_2 und FeCl_3 als Bariumsulfat nach Zusatz von Bariumchloridlösung.
- b) Nach einem Lassaigue-Aufschluß als Natriumsulfid mit Dinatriumpentacyanonitrosylferrat (II).

Der Reaktionsausfall war in beiden Fällen nur sehr schwach. Wenn es sich hier tatsächlich um die vermuteten schwefelhaltigen "Petasine" handelte, wäre geklärt,

1. weshalb sich diese Substanzen dünnschichtchromatographisch ähnlich wie die reinen "Petasine" verhalten und in verschiedenen Fließmitteln nicht abtrennbar sind und
2. weshalb sie nahezu identische UV-Absorptionsspektren aufweisen.

Die bei der quantitativen photometrischen Bestimmung nach DC-Auftrennung erhaltenen überhöhten Werte wären damit auch erklärt.

Dünnschichtchromatographisch wäre somit eine Gesamtbestimmung aller "Petasin"-Verbindungen der Droge möglich.

Da für die ϵ -Werte der Chromophor maßgeblich ist, können diese für die "Petasine" und "S-Petasine" als gleich angesehen werden. Man kann sich daher für eine quantitative Gesamtbestimmung auf Isopetasin beziehen und die Bestimmung bei 240 und 278 nm durchführen.

Eine solche Bestimmung ist aber nur dann sinnvoll, wenn die schwefelhaltigen Petasine eine gleiche oder ähnliche pharmakologische Wirkung wie die S-freien Petasine besitzen. Bis zur Klärung dieser Frage hat daher die gaschromatographische Bestimmung eindeutig den Vorzug.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine dünnenschichtchromatographische Methode zur Identitäts- und Reinheitsprüfung von Folia Cynarae ausgearbeitet, die auf dem Nachweis der für die Droge charakteristischen Flavonoide und Phenolcarbonsäuren beruht.

Das für das choleretische Wirkprinzip der Folia Cynarae, das Cynarin, entwickelte Wertbestimmungsverfahren sieht die DC-Auftrennung eines Extraktes und Elution des Cynarins mit nachfolgender Spektrophotometrie vor.

Mit Hilfe dieser Gehaltsbestimmung wurde der Cynaringehalt in der Droge, in Extrakten des Handels und bei Trocknungs- und Lagerungsvorgängen ermittelt. Für Cynara-Blattextrakte erwies sich das Gefriertrocknungsverfahren als die geeignetste Stabilisierungsmethode.

2. Zur Identitäts- und Reinheitsprüfung von Folia Oleae und deren Zubereitungen wurde eine DC-Methode entwickelt, die den Nachweis des für die Droge charakteristischen Oleuropeins und seines Abbauproduktes, des Dihydroxyphenyläthylalkohols, erlaubt.

Die Gehaltsbestimmung des blutdrucksenkenden Wirkprinzips erfolgte nach DC-Abtrennung mit Hilfe der Anthronmethode.

Nach dem Ergebnis der Gehaltsbestimmungen ist eine Stabilisierung von ^{*)} Drogenextrakten durch Lagerung in Stickstoffatmosphäre möglich. Den geringsten Wirkstoffverlust erzielt man durch 3stündige Trocknung der ganzen Blätter bei 40°. Durch DC und Spektroskopie gelang erstmals der Nachweis von Rutin in Folia Oleae.

3. Für den schnellen qualitativen Identitätsnachweis des für Fol. Petasites wertbestimmenden Petasins bzw. Isopetasins in den verschiedenen Petasites-Arten erwies sich wiederum die Dünnenschichtchromatographie als gut geeignet. Der Nachweis dieser Substanzen ist bei Verwendung von Dünnschichtplatten.

*) äthanolischen

mit Fluoreszenzindikatorzusatz auch ohne Besprühen auf Grund seiner Fluoreszenzminderung im kurzwelligen UV möglich.

Durch DC ist die Unterscheidung von Blatt- und Wurzelextrakten auf Grund eines bei Wurzelextrakten im langwelligen UV-Licht (336 nm) charakteristisch blau fluoreszierenden Fleckes möglich.

Die dünnenschicht- und gaschromatographischen Untersuchungen ergaben, daß als Stammpflanze für arzneilich zu verwendende Extrakte nur die beiden Arten Petasites hybridus und Petasites paradoxus in Frage kommen.

Während von Petasites hybridus die Wurzeln und die Blätter verwendet werden können, da sie annähernd den gleichen Petasin- und Isopetasingehalt aufweisen, sind von Petasites paradoxus nur die Blätter verwendbar. Die Wurzeln dieser Art enthalten nur sehr wenig Petasin. Nicht zu empfehlen ist wegen des niedrigen Petasingehaltes Petasites albus. Die Pflanze wäre als eine Verfälschung anzusehen.

Als weitere Verfälschung hat auch die "Furanrasse" von Petasites hybridus zu gelten, die allerdings unter den Pflanzen aus dem deutschen Einzugsbereich nicht anzutreffen ist.

Zur Standardisierung und Wertbestimmung der spasmolytisch wirksamen Petasine eignen sich die gaschromatographische Methode und die spektrophotometrische Bestimmung nach DC-Auftrennung und Elution. Die Gaschromatographie ist der zweiten Methode hinsichtlich Zeitaufwand, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überlegen.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. DROGENHERKUNFT

I. Folia Cynarae

1. Getrocknete Droge

Fa.Schönenberger (Magstadt bei Stuttgart) aus eigenem Anbau

2. Frisches Pflanzenmaterial

Frische, im Mai 1974 geerntete Artischockenblätter erhielten wir aus dem Institut für Gemüsebau der TU München in Weißenstephan bei Freising.

Wir untersuchten auch frische, auf dem Markt gekaufte Artischockenblütenköpfchen.

II. Folia Oleae

1. Getrocknete Droge

Für die Identitätsprüfung und Aufstellung der Wertbestimmung des Oleuropeins in den Ölbaumblättern verwendeten wir die Handelsdroge Folia Oleae der Fa.Rudolf Loibl KG, München. Zum Vergleich diente uns ein Drogenmuster, das uns die Fa.Vogel u.Weber, Inning/Ammersee, freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

2. Frisches Pflanzenmaterial

Zur Durchführung der Trocknungs- und Extraktionsversuche wurde frisches, selbst im April 1974 in Mijas/Málaga in Spanien gesammeltes Material verwendet. Es diente uns auch als Vergleichsdroge für den Identitätsnachweis.

III. Folia Petasites und Folia Farfarae

1. Getrocknete Droge

Die von uns verwendete getrocknete Droge entstammte durchwegs dem Drogenhandel: Folia Petasites, 1967 von der Fa.Duvernoy, Stuttgart, Folia Farfarae, 1971 von der Fa.Loibl, München, Folia Farfarae, 1973 von der Fa.Petereit, Elmshorn.

2. Frisches Pflanzenmaterial

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen fast ausschließlich frisches, selbst gesammeltes Material.

Petasites hybridus: München (Poschingerweiher) Isartal

Petasites albus: Berwang (Bachrand)

Petasites paradoxus: München (Großhesseloher Brücke)
Isartal

Tussilago farfara: München Biedersteinkanal

B. ZU DEN UNTERSUCHUNGEN VERWENDETE GALENISCHE ZUBEREITUNGEN

I. Folia Cynarae

Frischpflanzenpreßsaft der Fa. Walther Schönenberger/Magstadt

Trockenextrakte: Fa. Finzelberg's Nachf./Andernach/Rhein

Fa. Brenner/Alpirsbach

Verschiedene Spezialitäten aus der Apotheke.

II. Folia Oleae

Fluid-Extrakt: Fa. Vogel u. Weber/ Inning am Ammersee

Spezialitäten, die sich auf dem Arzneimittelmarkt befinden.

III. Folia Petasites

Die beiden "chemischen Rassen" von Petasites hybridus (Petasinrasse und Furanrasse) wurden uns bereits als Wurzel-Petroläther-Extrakte freundlicherweise von Prof. Herout u. Novotny (Prag) zur Verfügung gestellt.

Fluid-Extrakt: Fa. Vogel u. Weber, Inning am Ammersee

Kapseln: Fa. Vogel u. Weber, Inning am Ammersee

"Petasin"-Spissum-Extrakt 40%ig: Fa. Max Zeller Söhne A.G., Rom.

"Entspannungs"-Dragees: Fa. Max Zeller Söhne AG, Romanshorn

Für die Beschaffung der frischen Artischockenblätter danken wir in besonderer Weise Herrn Dr. Ch. Franz, Weißenstephan.

C. HERSTELLUNG DER EXTRAKTE

I. Folia Cynarae

Ca. 80 g frische Droge kleingeschnitten oder 20 g Drogenpulver, Sieb 4 DAB 7 BRD, von getrocknetem Pflanzenmaterial wurden mit ca. 200 ml Äthanol am Rückfluß 20 Min. erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und die Droge ausgepreßt. Der so erhaltene Extrakt wurde auf ca. 25 ml eingeeengt und zur qualitativen Chromatographie und für die Stabilitätsversuche verwendet.

Die Herstellung eines Frischpreßsaftes erfolgte, indem man die frisch geernteten Blätter etwa 2 Stdn. bei -20° tiefgefrieren ließ, anschließend die noch gefrorenen Blätter in einem Multimixer zerkleinerte und nach dem Auftauen mit einer Handfruchtsaftpresse auspreßte.

II. Folia Olea

10 g Drogenpulver, Sieb 4 DAB 7 BRD, wurden 4 Stdn. am Rückfluß mit ca. 200 ml Äthanol extrahiert, nach dem Abkühlen filtriert und abgepreßt. Der erhaltene Extrakt wurde auf ca. 50 ml eingeeengt und direkt zur qualitativen Chromatographie und für die Stabilitätsversuche verwendet.

III. Folia Petasites

Die frischen Blätter und Wurzeln wurden gewaschen, an der Luft getrocknet und zerkleinert.

Die Extraktion der pulverisierten Blattdroge erfolgte am Rückfluß mit Petroläther bei Wasserbadtemperatur über 15 Min.. Pro g Blattdroge sind für die Extraktion 20 - 25 ml Petroläther nötig und man geht am zweckmäßigsten von 4 - 5 g Drogenmaterial aus. Der Extrakt wurde filtriert, der Rückstand mit einigen Millilitern Petroläther nachgewaschen und das Filtrat auf ca. 0.5 - 1 ml pro Gramm Ausgangsmenge eingeeengt. Die Wurzeln wurden kleingeschnitten und im selben

Verhältnis (1:20-25) mit Petroläther am Rückfluß extrahiert. Das erhaltene Filtrat wurde wie der Blattextrakt auf ca. 0.5 - 1 ml pro g Ausgangsmenge eingengt.

Um die Polyphenol-Fraktion zu erhalten, extrahierten wir 10 g pulverisierte Droge mit ca. 150 ml Methanol/Wasser (1:1) 30 Min. am Rückfluß, filtrierten und preßten ab. Der erhaltene Extrakt wurde auf ca. 50 ml eingengt.

D. HERKUNFT DER VERGLEICHSSUBSTANZEN

Cynarin puriss.	Smp. = 225 - 227 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Chlorogensäure puriss.	Smp. = 208 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Isochlorogensäure	Smp. = 144 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Kaffeensäure	Smp. = 223 - 225 ⁰	Schuchardt, München
Cynarosid = Luteolin-7-glucosid	Smp. = 251 - 257 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Oleuropein *1)	Smp. = 87 - 89 ⁰	Prof. Inouye, Kyoto Prof. Panizzi, Rom
Rutin puriss.	Smp. = 214 - 215 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Luteolin	Smp. = 328 - 330 ⁰	am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München isoliert
Quercetin	Smp. = 314 ⁰	C.Roth, Karlsruhe
Petasin **2)	Smp. = 70 - 72 ⁰	Prof. Herout und Prof. Novotny, Prag
Isopetasin	Smp. = 98 ⁰	
Furanopetasin	Smp. = 113 - 116.5 ⁰	
Albopetasin	Smp. = 106 ⁰	
Palmitinsäuremethylester	Smp. = 28 - 30 ⁰	Merck, Darmstadt
Isoquercitrin	Smp. = 220 ⁰	am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München isoliert
Astragalin	Smp. = 178 ⁰	

§

*1) Ich danke Herrn Professor Inouye, Pharmazeutische Fakultät der Universität Kyoto/Japan und Herrn Professor Panizzi, Organisch-chemisches Institut der Universität Rom, welche uns lebenswürdig Oleuropein zur Verfügung stellten.

*2) Mein Dank gilt auch Herrn Professor Novotny, Institut für organische Chemie und Biochemie in Prag, der uns freundlicherweise Petasin, Isopetasin, Furanopetasin und Albopetasin zur Verfügung stellte.

E. ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

Dünnschichtchromatographie

I. Folia Cynarae

1. Adsorbens

Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Fa. Merck

2. Laufmittelsystem

Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3)

3. Detektion

A. Unter dem UV-Licht:

- a) Fluoreszenzminderung bei 254 nm
- b) Blaue Eigenfluoreszenzen bei 366 nm
- c) Bedampfen mit NH_3 konz. und Betrachten bei 366 nm

B. Sprühreagentien:

- a) äthanolische FeCl_3 -Lösung 2%ig
- b) methanolische KOH 5%ig

Sprühreagentien zum Nachweis der flavonoiden Inhaltsstoffe

Lösung I Naturstoffreagens (Diphenylborsäure- β -aminoäthylester) in MeOH 1%

Lösung II Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol 5%
Nacheinander mit Lösung I und II besprühen und im UV-366 nm-Licht betrachten.

II. Folia Oleae

1. Adsorbens

a) Oleuropein:

Kieselgel-Fertigfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Fa. Macherey u. Nagel u. Co., Düren

b) Flavonglykoside und Zucker:

Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Fa. Merck

c) Aglykone: Cellulose-Fertigplatten der Fa. Merck

2. Laufmittelsysteme

- a) Oleuropein:
Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3)
- b) Flavonglykoside:
Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)
Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2.2)
- c) Aglykone: Essigsäure 40%
- d) Zucker: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2:1:2)

3. Detektion

A. Unter dem UV-Licht

Oleuropein: Fluoreszenzminderung bis 254 nm

B. Sprühreagentien

- a) wässer. FeCl_3 -Lösung 2%ig
- b) H_2SO_4 20%ig
Nachbehandlung: 10 Min. bei 105° erhitzen
- c) Anthron- H_2SO_4 konz. Reagens 0.2%
- d) Flavonglykoside: siehe unter Folia Cynarae S. 95
- e) Aglykone: Bas. Bleiacetat: gesättigte wässrige
Lösung von bas. Bleiacetat
- f) Zucker: Lösung von 0.5 g Benzidin und 1.5 g Tri-
chloroessigsäure in 100.0 g Äthanol

III. Folia Petasites

1. Adsorbens

Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Fa. Merck

2. Laufmittelsysteme

- a) Sesquiterpene: Chloroform p.a. (Kammersättigung)
- b) Flavonglykoside: siehe unter Folia Oleae S. 95

3. Detektion

A. Fluoreszenzminderung unter dem UV-Licht von 254 nm

B. Sprühreagentien:

- a) Sesquiterpene: Lösung I Anisaldehyd/Eisessig (60.5:10)
(modifiziertes Kagi-Mischer-
Reagens auf Steroide)

Lösung II H_2SO_4 konz. (96%)

Nach dem Besprühen mit der Lösung I wird die Platte 10 Min. im Trockenschrank bei $120 - 130^\circ$ erhitzt und anschließend die noch heiße Platte mit Lösung II vorsichtig besprüht.

b) Flavonglykoside: siehe unter Folia Cynarae S. 95

Gaschromatographie

Petasites Petroläther-Extrakt

Modell: Perkin Elmer 900
Säule: Glassäule, 1.8 m · 2 mm i.D.
Säulenfüllung: UCCW 982, 10% auf Chromosorb W AW DMCS 80 - 100 mesh
Temperaturen: Säulenofen: $100 - 250^\circ\text{C}$, $6^\circ/\text{Min.}$ linear programmiert
Einlaß und Detektor: je 280°C
Detektor: FID ($\text{H}_2:\text{O}_2 = 35 \text{ ml/Min.} : 350 \text{ ml/Min.}$)
Trärgas: Argon, spezialgereinigt, ca. 30 ml/Min.
Einspritzmenge: ca. 3 - 4 μl des Petrolätherextraktes 1 g Droge / 1 ml
Schreiber: Perkin Elmer S 56
Papiervorschub: 5 mm/Min.

Aufbereitung des frischen Pflanzenmaterials

a) Trocknung an der Luft

Die frischen Blätter wurden in etwa 1 cm^2 große Stücke geschnitten und in dünner Schicht zur Trocknung bei Zimmertemperatur ausgebreitet.

b) Im Trockenschrank

Die ganzen oder die wie oben geschnittenen Blätter wurden im Trockenschrank bei 40° (zu den Trocknungsversuchen auch bei 60° und 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

c) Gefriertrocknung

Die geschnittenen frischen Blätter wurden in dünner Schicht ausgebreitet, bei -20°C eingefroren. Das gefrorene Drogenmaterial wurde in eine Leybold-Gefriertrocknungsanlage (G 07) übergeführt, wo die Entfernung des Wassers durch Sublimation im Vakuum erfolgte.

Bestimmung des Wassergehaltes

Der Wassergehalt der frischen Blätter bzw. der Restwassergehalt in getrockneter, gelagerter Droge wurde über die Bestimmung des Trocknungsverlustes nach DAB 7 BRD ermittelt. 1 g (genau gewogen) frischer oder getrockneter, geschnittener Droge werden im Trockenschrank 2 Stdn. bei 105⁰ getrocknet.

Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden in der Trockenpistole bei den den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen über Diphosphorpentoxid getrocknet. Den Schmelzintervall bestimmten wir mit der Mikroschmelzapparatur nach Kofler.

UV-Spektren, UV- und VIS-Messungen

Einzelmessungen wurden mit einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II, mit einem Eppendorf Photometer und einem Hitachi UV-VIS Spektrometer 181-6 in 1 cm Küvetten durchgeführt. Spektren wurden mit einem Beckman DK-2A ratio recording Spektrophotometer in 1 cm Küvetten aufgenommen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckman-Spektrophotometer IR-8 in KBr aufgenommen.

Massenspektren

Das Spektrum für den Dihydroxy-phenyläthylalkohol wurde mit einem Massenspektrographen MS 30 der Fa.AEI, Manchester, aufgenommen. Mein Dank für die Ausführung gilt Herrn O.Seligmann, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

F. DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNGEN - FOLIA CYNARAE

1. Identifizierung der Phenolcarbonsäuren und Polyoxyflavone

a) Extraktion:

10 g Drogenpulver, Sieb 4, DAB 7 BRD (bzw. eine nach Zusammensetzung entsprechende Anzahl zerkleinerter Draagees) werden 12 Stdn. einer kontinuierlichen Soxhlet-Extraktion (Soxhlet-Extraktionshülsegröße 25 x 70 mm) mit ca. 100 ml Äthanol unterworfen. Der gewonnene Extrakt wird am Rotationsverdampfer auf ca. 15 ml eingengt, in ein 25 ml Meßkölbchen gegeben, 3mal mit je 2 ml Äthanol nachgespült und mit Äthanol auf 25 ml aufgefüllt.

100 ml Artischockenpreßsaft (bzw. andere flüssige Arzneispezialitäten) werden in einem 250 ml Schliff-Rundkolben am Rotationsverdampfer bis zur Sirupkonsistenz eingengt. Der Rückstand wird mit 40 ml Aceton, dem ca. 0.5% Eisessig zugefügt wurden, versetzt, der Kolben verschlossen und öfters geschüttelt. Zur quantitativen Lösung wurde dieser Vorgang nochmals mit 40 ml essigsauerm Aceton und ein drittes Mal mit abermals 40 ml desselben Lösungsmittels wiederholt. Die gesammelten filtrierte Acetonextrakte werden am Rotationsverdampfer stark eingengt und dann in einem 25 ml-Meßkölbchen bei 20° mit Aceton auf die Marke aufgefüllt.

Für die Dünnschichtchromatographie werden 50 µl entnommen und strichförmig (15 x 3 mm) aufgetragen.

b) Adsorbens:

Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Fa. Merck

c) Fließmittelsystem:

Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3)

d) Laufzeit:

75 Min. bei Kammersättigung über eine Strecke von 15 cm

e) Detektion:

Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm

Eigenfluoreszenz bei UV 366 nm

f) Sprühreagentien:

Phenolcarbonsäuren: FeCl_3 -Lösung wässrig 2%

Weitere Reagentien: (siehe Seite 95)

Nachweis der Polyoxyflavone

Lösung I Naturstoffreagens (Diphenylborsäure- β -aminoäthylester) in MeOH 1%

Lösung II Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol 5%

Nacheinander mit Lösung I und II besprühen und im UV 366 nm betrachten.

II. Quantitative Bestimmung des Cynarins

1. Vorbereitung der Droge oder einer galenischen Zubereitung

a) Extraktion: siehe unter Identitätsprüfung Seite 99

b) DC-Trennung:

Von dem nach Vorschrift hergestellten Extrakt werden mit einer Blutzuckerpipette 5 Bahnen von je 0.05 ml auf eine Kieselgel-60 Fertigplatte F_{254} strichförmig (1.5 - 2 cm) aufgetragen und im Laufmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (20:2:3) bei 22°C Raumtemperatur bis zu einer Höhe von ca. 15 cm (75 Min. Laufzeit) chromatographiert. Für den Blindwert wird eine Bahn freigelassen.

c) Detektion: UV 254 nm Fluoreszenzminderung

Cynarin wird nach dem Trocknen der Platten unter dem UV-Licht 254 nm bei einem R_f von 0.5 mit einem Bleistift markiert. Betrachtet man anschließend das Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 366 nm, so tritt im tieferen R_f -Bereich bei ca. 0.35 die hellblaufluoreszierende Chlorogensäure hervor.

2. Gehaltsbestimmung mittels indirekter photometrischer

Absorptionsmessung

a) Elution des Cynarins aus der Platte

Die Markierung des Cynarins erfolgt in Form von Recht-

ecken, die die ganze fluoreszenzmindernde Fläche mit einem neutralen Rand von ca. 1 mm umschließen.

Der freigelassenen Bahn entnimmt man für den Blindwert ein ebenso großes Rechteck substanzfreies Kieselgel.

Die markierten Cynarinflecken werden mit einem feinen Spatel scharf abgegrenzt und vorsichtig von der Platte abgeschabt. Die auf einem Kartenblatt gesammelten Kieselgelmengen werden in 10 ml Schliffzentrifugierröhrchen überführt und jeweils mit 4 Glasperlen und 5 ml Methanol p.A. aus einer Vollpipette versetzt. Man rührt die Zentrifugierschliffröhrchen jeweils 2 Min. auf einem Whirlimixer (Fa.Fisons, Loughborough/England) und zentrifugiert 10 Min. bei 3000 Umdrehungen vom Kieselgel ab. Die überstehenden klaren "Analysenlösungen" überführt man in 1 cm Spezialküvetten mit 1 ml Rauminhalt und führt die spektralphotometrische Bestimmung bei 325 nm gegen die in gleicher Weise bereitete Blindlösung durch.

b) Aufstellen der Eichgeraden

α. Direkte Messung der Lösung

Mit 5 mg, genau gewogen, Cynarin puriss. (Fa.Roth) wird in einem 5 ml Meßkölbchen eine methanolische Stammlösung bereitet. Dieser Stammlösung werden für eine Bestimmungsreihe 0.01; 0.025; 0.05; 0.075 und 0.1 ml entnommen und in graduierten Schliffzentrifugierröhrchen auf 5 ml mit Methanol p.A. aufgefüllt. Diese Lösungen werden wie oben beschrieben photometrisch gemessen.

β. Eichgerade der Cynarinstammlösung nach Elution von der Platte

Von der oben beschriebenen Stammlösung 5 mg/5 ml werden aliquote Anteile (0.01 - 0.05 ml) auf eine Kieselgel 60 Fertigplatte F₂₅₄ (Fa.Merck, Darmstadt) aufgetragen und die Bestimmung wie oben angegeben durchgeführt.

c) Gehaltsberechnung

Die μg Cynarin, die den gemessenen Extinktionen entsprechen, kann man auf zwei verschiedene Arten ermitteln:

1. aus der Eichgeraden des Cynarins (vergl. Seite 25) kann man direkt die μg Cynarin ablesen.
2. Eine exaktere Ermittlung der μg Cynarin gewährleistet eine mitchromatographierte und gleichbehandelte Testlösung. Da dabei genau die gleichen Bedingungen für Analysen- und Testlösung gegeben sind, ist diese Methode vorzuziehen, wenn Cynarin als Testsubstanz zur Verfügung steht. Der Gehalt ist aus dem Verhältnis der gemessenen Extinktionen der Analysen- und Testlösung nach folgender Formel zu errechnen:

$$\mu\text{g Cynarin} = \frac{E_A}{E_{ST}} G_{ST}$$

E_A = gemessene Extinktion der Analyse

E_{ST} = gemessene Extinktion des Standards

G_{ST} = eingesetzte Menge (μg) Standard

Der %-Gehalt an Cynarin einer Droge oder deren galenische Zubereitung kann direkt mit folgender Berechnungsformel ermittelt werden:

$$\% \text{ Cynarin} = \frac{5 \cdot E_A \cdot G_{ST}}{E_{ST} \cdot 10^2 \cdot G_D}$$

E_A = gemessene Extinktion bei 325 nm

E_{ST} = Extinktion des Standards

G_{ST} = Menge des Standards in mg

G_D = eingesetzte Drogenmenge bzw. Volumen des extrahierten Frischpflanzenpreßsaftes u.ä.

Die Zahl 5 in dieser Formel ist bei Einhalten der beschriebenen Methode eine Konstante.

FOLIA OLEAE

I. Identitätsnachweis über das Oleuropein bzw. dessen Abbau-
produkt

a) Extraktion:

5 g Drogenpulver, Sieb 4, DAB 7 BRD, (bzw. eine nach Zusammensetzung entsprechende Anzahl zerkleinerter Dragees, Tabletten oder aufgeschnittener Kapseln) werden mit Petroläther am Soxhlet bis zur Farblosigkeit des Extraktionsmittels vorgereinigt und dann 4 Stdn. einer kontinuierlichen Soxhlet-Extraktion (Soxhlethülsegröße: 25 x 70 mm) mit ca. 50 ml Äthanol p.a. unterworfen. Der gewonnene Extrakt wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, mit Wasser aufgenommen und auf dem siedenden Wasserbad 1 Stde. digeriert. Man filtriert von dem ausgefallenen Chlorophyll ab und schüttelt den wässrigen Extrakt ca. 20mal mit kleinen Portionen von heißem Äthylacetat aus. Die vereinigten Äthylacetatausschüttelungen werden am Rotationsverdampfer eingengt, in ein 50 ml Meßkölbchen gegeben, mit Äthylacetat 3mal nachgespült und mit Äthylacetat bei 20° auf die Marke aufgefüllt.

Fluidextrakte und andere flüssige Zubereitungen werden ohne vorherige Extraktion sofort mit heißem Äthylacetat ausgeschüttelt und wie oben auf die Volummenge von 50 ml gebracht.

Für die Dünnschichtchromatographie werden 100 µl entnommen und strichförmig (15 x 3 mm) aufgetragen.

- b) Adsorbens: Kieselgel-Fertigfolie Polygram SIL/UV₂₅₄ der Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren
- c) Fließmittelsystem: Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3)
- d) Laufzeit: 90 Min. bei Kammersättigung über 15 cm
- e) Detektion: Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm
- f) Sprühreagentien: FeCl₃-Lösung 10% wässrig

II. Charakterisierung der flavonoiden Inhaltsstoffe

a) Extraktion:

Zur Dünnschichtchromatographie können die wie auf Seite 95 beschrieben, hergestellten Auszüge verwendet werden. Es werden 50 µl strichförmig (15 x 3 mm) aufgetragen.

b) Adsorbens: Kieselgel-60-mesh-F 254 Fertigplatten der Fa. Merck

c) Fließmittelsystem: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

d) Laufzeit: 90 Min. über eine Strecke von 15 cm bei Kammer-sättigung

e) Sprühreagentien: Lösung I Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol 5%

Lösung II Naturstoff-Reagens (Diphenylborsäure-β-aminoäthylester) in MeOH 1%

Nacheinander mit Lösung I und II besprühen und im UV-366 nm Licht betrachten.

III. Identifizierung des Dihydroxyphenyläthylalkohols

a) Saure Hydrolyse

Der Olivenblätterextrakt bzw. reines Oleuropein wurden mit 5 ml 5%iger Salzsäure 24 Std. versetzt stehen gelassen. Durch Ausschütteln mit 10 ml Äthylacetat wurde das Aglykon aus dem Hydrolysat gewonnen. Die Äthylacetatphase wurde einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterworfen.

b) Isolierung des 3,4-Dihydroxyphenyläthylalkohols

Die durch präparative Dünnschichtchromatographie gewonnene stark fluoreszenzlöschende Zone bei R_f 0.78 wurde nach Entnahme von den Folien auf einer kleinen Säule in der Kälte mit Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft und zu dem in heißem Methylenchlorid gelösten Rückstand tropfenweise siedender Tetrachlorkohlenstoff bis zu einer Konzentration von 1:1 gegeben. Dabei kristallisierten Nadeln vom Smp. 80° aus.

c) Massenspektrum

Base peak m/e 212 (relative Intensität: 100%) M^+ 154
123 ($C_7H_7O_2$); 124 ($C_7H_8O_2$).

IV. Identifizierung des Rutins

a) Saure Hydrolyse

Der Drogenauszug wurde mit 5 ml 5%iger Salzsäure 6 Stdn. am Rückflußkühler erhitzt. Durch Ausschütteln mit 10 ml Äthylacetat wurden die Aglyka aus dem Hydrolysat gewonnen. Die Äthylacetatphase wurde zur Chromatographie verwendet. Bei R_f von ca. 0.24 wird der gelbe Fleck des Luteolins sichtbar und unmittelbar darüber bei R_f ca. 0.3 erscheint ein orangeroter, identisch mit Quercetin.

b) Dünnschichtchromatographie der Hydrolyseprodukte

Adsorbens: Cellulose-Fertigplatten Merck

Fließmittel: 40%ige Essigsäure

Sprühreagens: Bas.Bleiacetat

c) Identifizierung der Zucker

Der wässrige Rückstand des Hydrolysates wurde zur Neutralisation mit Dowex-Ionenaustauscher-Harz (Typ 50 WX 12, mesh 100 - 200) der Fa.Serva versetzt, im Vakuum eingengt und in 1 ml Pyridin aufgenommen.

Diese Lösung wurde zur Identifizierung der Zucker auf Kieselgel-60-mesh-F 254 Fertigplatten der Fa.Merck in dem Laufmittelsystem n-Butanol-Pyridin-Wasser (35:20:15) chromatographiert. Glucose und Rhamnose wurden als Testsubstanzen mitchromatographiert. Zur Detektion wurde mit Diphenylamino-Phosphorsäure (2.0 g Diphenylamin, 2 ml Anilin, 10 ml Phosphorsäure 85%ig, Methanol ad 100.0) besprüht. Nach dem Erhitzen (10 Min. bei 110°) erschien ein Fleck bei R_f 0.6 (Glucose) und ein zweiter bei R_f 0.75 (Rhamnose).

V. Quantitative Bestimmung des Oleuropeins

1. Vorbereitung der Droge oder galenischen Zubereitung

a) Extraktion: siehe unter Identitätsprüfung Seite 103

b) DC-Trennung:

Von dem nach der Vorschrift hergestellten Extrakt werden mit einer Blutzuckerpipette 5mal 0.1 ml auf eine Kiesel-

gel-Fertigfolie Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Fa. Macherey, Nagel u. Co., Düren) strichförmig (1.5 - 2 cm) aufgetragen und im Laufmittel Äthylacetat-Dioxan-Wasser (30:10:0.3) bis zu einer Höhe von 20 cm chromatographiert.

c) Detektion: UV 254 nm Fluoreszenzminderung

Oleuropein, R_f ca. 0.42, wird nach dem Trocknen der Folien unter dem UV-Licht 254 nm mit einem Bleistift markiert.

2. Bestimmung des Oleuropeins mit der Anthron-Methode

a) Elution vom Kieselgel

Für die Oleuropeinbestimmung entnimmt man der Folie den unter dem UV-Licht in Form eines Rechteckes markierten Bereich mit einem neutralen Rand von ca. 1 mm.

Für die Blindprobe entnimmt man der Folie an einer vom Laufmittel durchzogenen "Leerstelle" ein ebenso großes Flächenstück (ca. 6 cm²).

Die sorgfältig mit einem feinen Spatel und einem Bürstchen von der Folie abgelösten Kieselgelzonen werden in 10 ml Schliffzentrifugierröhrchen mit 5 ml H₂O aus einer Vollpipette und jeweils 3 Glaskügelchen versetzt und 2 Min. lang mit dem Whirlimixer (Fa. Fisons, Loughborough/England) extrahiert. Dann zentrifugiert man bei 3000 Umdrehungen 10 Min. vom Kieselgel ab.

b) Durchführung der Bestimmung

Reagenslösung: 0.2%ige Lösung von Anthron (Fa. Merck) in 96%iger H₂SO₄ p.a.

Die Lösung ist im Kühlschrank einen Tag haltbar. Der oben erhaltenen überstehenden und abdekantierten Lösung entnimmt man mit einer Vollpipette genau 2 ml für die Analyse und gibt sie in ein 10 ml Schliffzentrifugierröhrchen mit Schliffstopfen. In jedes dieser Gläser gibt man nun einen Tropfen einer 6%igen wässrigen Ammoniumreineckatlösung bis zur leichten Rosafärbung der Lösung und versetzt im Eisbad mit 5.0 ml

0.2%iger Anthronlösung in 96%iger Schwefelsäure und erhitzt 5 Min. im siedenden Wasserbad.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur (ca. 15 Min.) wird die Extinktion bei 623 nm gegen die auf dieselbe Art behandelte Blindlösung gemessen.

Für diese Messung kann auch ein Eppendorf-Photometer mit einer Quecksilberdampflampe und dem Filter 623 nm verwendet werden.

Man verwendet keine Eichgerade für die Ermittlung des Glucosegehaltes, sondern führt bei jeder Versuchsreihe gleichzeitig Bestimmungen mit einer Glucoselösung durch: 9.5 mg Glucose wasserfrei (Merck Nr.8337), genau gewogen, werden in 100 ml Wasser gelöst. 2.0 ml davon werden auf 5.0 ml mit Wasser ergänzt und 2.0 ml dieser Lösung genauso wie die 2.0 ml der Oleuropeinlösung wie oben beschrieben weiterbehandelt. Dadurch werden die erforderlichen, gleichen Reaktionsbedingungen für alle Proben gewährleistet.

Die μg Oleuropein werden aus dem Verhältnis der Extinktionen und des Molekulargewichtes folgendermaßen berechnet:

$$\mu\text{g Oleuropein} = \frac{\text{Ex}_A}{\text{Ex}_{G1}} \cdot M_{G1} \cdot \frac{MG_{O1}}{MG_{G1}}$$

Ex_A = gefundene Extinktion der Analysenlösung für Oleuropein

Ex_{G1} = gemessene Extinktion des Glucose-Testes

M_{G1} = eingesetzte μg Glucose in der Testlösung

MG_{O1} = Molekulargewicht Oleuropein

MG_{G1} = Molekulargewicht Glucose

Da in der Analysenlösung nur 2/5 der ursprünglich aufgetragenen Menge Extraktes enthalten sind, muß das Ergebnis der Messung mit 5/2 multipliziert werden.

Der %-Gehalt einer Droge oder deren galenische Zubereitung kann direkt bei Einhaltung der gegebenen Vorschrift mit folgender Berechnungsformel ermittelt werden:

$$\% \text{ Oleuropein} = \frac{3 \cdot E_{w_{gl}} \cdot Ex_a}{E_{w_d} \cdot Ex_{gl}}$$

$E_{w_{gl}}$ = Einwaage Glucose wasserfrei in mg/100 ml

E_{w_d} = Einwaage der Droge in g/50 ml

Ex_a = gemessene Extinktion der Analyse bei 623 nm

Ex_{gl} = gemessene Extinktion des Glucose-Testes

Die Zahl 3 in der Formel ist bei Einhalten der beschriebenen Methode eine Konstante und ergibt sich aus folgender Berechnung:

1. mg Einwaage Glucose wasserfrei in 100 ml H_2O gelöst
2 ml dieser Stammlösung werden auf 5 ml ergänzt,
2 ml davon werden als Testlösung entnommen:

$$\begin{array}{l} \mu g \text{ Glucose wasserfrei} \\ \text{in 2 ml Testlösung} \end{array} = \frac{\text{mg } E_{w_{gl}} \cdot 2 \cdot 10^3}{50 \cdot 5} = 8 \cdot E_{w_{gl}}$$

2. Extinktion_{gl} : $Ex_a = \mu g_{gl} : x$ ($x = \mu g$ Glucose in der Analyse)

$$x = \frac{Ex_a \cdot \mu g_{gl}}{Ex_{gl}}$$

$$1. \text{ in } 2. \quad x = \frac{Ex_a \cdot E_{w_{gl}} \cdot 8}{Ex_{gl}}$$

3. $MG_{\text{Oleuropein}} : MG_{\text{Glucose}} = y : x$ ($y =$ gesuchte μg Oleuropein in der Analyse)

$$y = \frac{MG_{01}}{MG_{gl}} \cdot x = \frac{540.53}{180.16} \cdot x = 3 \cdot x$$

$$y = \frac{3 \cdot Ex_a \cdot E_{w_{gl}} \cdot 8}{Ex_{gl}}$$

4. DC-Auftragung 100 μ l

Drogeneinwaage g/50 ml

100 μ l in 5 ml, davon 2 ml als Analysenlösung

100 μ l enthalten 2.5 y

50 ml enthalten 1250 y; 50 ml enthalten $3.75 \cdot 10^{-3} x$

$$5. \frac{Ew_d \text{ in g}}{3.75 \cdot 10^{-3} x} = \frac{100}{\%} ; \%_{01} = \frac{0.375 \cdot x}{Ew_d}$$

$$\%_{01} \text{leuropein in der Droge} = \frac{0.375 \cdot Ex_a \cdot Ew_{gl} \cdot 8}{Ew_d \cdot Ew_{gl}} =$$

$$\frac{3 \cdot Ew_{gl} \cdot Ex_a}{Ew_a \cdot Ex_{gl}}$$

FOLIA PETASITES

I. Identifizierung eines Petasites-Auszuges

a) Extraktion:

10.0 g pulverisierte Blätter oder Wurzeln, Sieb 4, DAB 7 BRD (bzw. eine entsprechende Anzahl Tabletten, Dragees u.ä.) werden mit der 20 bis 25fachen Menge Petroläther (Sdp. 35 - 45°C) 30 Min. auf dem Wasserbad unter Rückfluß extrahiert. Der Petrolätherextrakt wird abfiltriert und der Drogenrückstand erneut mit der gleichen Menge Petroläther 10 Min. in der gleichen Weise behandelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 30°C bis zur Trockene eingengt und mit 10 ml Methanol aus einer Vollpipette aufgenommen.

50.0^{mg} (genau gewogen) von Fluid-, Spissum- oder Trockenextrakten des Handels werden in einem 5 ml Meßkölbchen in Methanol gelöst.

Für die Dünnschichtchromatographie werden 50 µl entnommen und strichförmig (15 x 3 mm) aufgetragen.

b) Adsorbens: Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Fa. Merck

c) Fließmittelsysteme: CHCl₃ p.a. (Kammersättigung!) (Terpene)
Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser(10:2:3)
(Flavonoide Inhaltsstoffe)

d) Laufzeit: 60 - 70 Min. bei Kammersättigung über eine Strecke von 15 cm

e) Detektion: Fluoreszenzminderung bei UV 254

f) Sprühreagentien: Sesquiterpene:

Lösung I Anisaldehyd/Eisessig (0.5:10)
(modifiziertes Kägi-Mischer-Reagens
auf Steroide)

Lösung II H₂SO₄ konz. (96%)

Nach dem Besprühen mit der Lösung I wird die Platte 10 Min. im Trockenschrank bei 120 - 130° erhitzt und anschließend die noch heiße Platte mit Lösung II vorsichtig besprüht.

Flavonglykoside:

Lösung I Naturstoffreagens in MeOH 1%

Lösung II Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol 5%

Nacheinander mit Lösung I und II besprühen und
im UV-Licht 366 nm betrachten.

II. Schleimgehaltsbestimmung

a) Herstellung der Auszüge

1.0 g Drogenpulver werden mit 9.0 ml warmen Wasser von 60 - 70° versetzt und in einem Reagensglas 10 Min. mit Hilfe eines Whirlmixers extrahiert.

Zur Herstellung von Dekokten wird 1.0 g pulverisierte Droge mit 10 ml heißem H₂O von 90° übergossen und 30 Min. auf dem Wasserbad auf der gleichen Temperatur gehalten, anschließend heiß filtriert.

b) Ausfällen des Schleimes

Die nach Vorschrift hergestellten Warmwasserauszüge und Dekokte werden in 20 ml 1% Essigsäure enthaltendes Äthanol 96%ig unter Rühren gegossen. Der ausfallende Rohschleim verursacht Trübungen oder Niederschlag. Er wird abfiltriert, mit warmem Wasser von 60 - 70° aufgenommen und nochmals wie oben durch Eingießen in Äthanol umgefällt.

III. Quantitative Bestimmung der "Petasine"

1. Photometrische Absorptionsmessung

Vorbereitung der Droge oder deren galenische Zubereitungen

a) Extraktion:

Der zur Trockene eingeengte Petrolätherextrakt von ca. 20.0 g genau gewogenen Folia Petasites hybridus bzw. 50 - 100 mg des genau gewogenen Handelsextraktes werden im Meßkölbchen in 5 ml Methanol p.a. gelöst (Herstellung des Petrolätherextraktes siehe Seite 110).

b) DC-Trennung:

Von den nach Vorschrift hergestellten Extraktlösungen werden 2mal drei verschiedene Konzentrationen (0.05 ml, 0.075 ml, 0.1 ml) mit einer Blutzuckerpipette auf eine Kieselgel 60 Fertigplatte F₂₅₄ (Fa. Merck, Darmstadt) strichförmig (1.5 - 2 cm) aufgetragen. Nach Entwicklung in Chloroform p.a. bei Kammer sättigung über 20 cm erscheinen im mittleren R_f-Bereich im kurzwelligen UV-Licht bei 254 nm zwei dicht übereinanderliegende, fluoreszenzmindernde Flecke, bei denen es sich um Petasin und Isopetasin handelt.

c) Durchführung:

Die in Form von Rechtecken markierten Flecke, die die ganze fluoreszenzmindernde Fläche und eine neutrale Randzone umschließen und eine gleichgroße, ebenfalls vom Laufmittel durchzogene "Leerstelle" für die Blindprobe werden vorsichtig mit einem feinen Spatel und einem Bürstchen von der Platte abgekratzt. Die auf Kartenblätter gesammelten Kieselgelmengen werden in 10 ml Schliffzentrifugiergläsern mit Schliffstopfen übertragen, jeweils mit 3 Glaskügelchen und 5.0 ml Methanol aus einer Vollpipette versetzt und die verschlossenen Gläser 15 Min. ins 60° heißes Wasserbad gestellt. Anschließend schüttelt man 2 Min. auf einem Whirlimixer (Fa. Fisons, Loughborough/England) und setzt sie 7 Min. einem Ultraschallbad (Fa. Bandelin-

Sonorex, Berlin/BRD) aus. Nach dem Abzentrifugieren (10 Min. bei 3000 Umdrehungen) wird bei 280 nm in einem Spektralphotometer IDB G (Fa.Beckman) gegen den Blindwert gemessen.

d) Aufstellen der Eichgeraden

Von 5.0 mg Isopetasin, genau gewogen, wird in einem 5 ml Meßkölbchen eine methanolische Stammlösung bereitet.

Dieser Lösung werden für eine direkte photometrische Bestimmungsreihe 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 und 0.1 ml entnommen, diese Mengen in graduierte 10 ml Schliff-röhrchen übergeführt und auf 5 ml mit Methanol p.a. aufgefüllt. Die Extinktionen werden bei 240 und 278 nm gemessen. Für die Aufstellung einer Eichgeraden, die den Verlust durch irreversible Adsorption an Kieselgel berücksichtigt, werden 5 Bahnen mit 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 und 0.1 ml auf eine Kieselgel 60 Fertigplatte F₂₅₄ (Fa.Merck, Darmstadt) mit einer Blutzuckerpipette aufgetragen und die Bestimmung wie unter 1. b) und c), S.112, durchgeführt.

e) Gehaltsberechnung

Die Berechnung des Petasin-Isopetasin-Gemisches, die den ermittelten Extinktionen entsprechen, kann über die Eichgerade erfolgen. Die µg Isopetasin können direkt abgelesen werden. Der Gehalt an Isopetasin-Petasin, berechnet als Isopetasin, einer Droge oder deren galenischen Zubereitungen kann mit folgender Formel bei Einhaltung der gegebenen Vorschrift berechnet werden:

Berechnungsformel:

$$\% \text{ Isopetasin} = \frac{100 \cdot E_A \cdot G_{ST} \cdot V_{ST}}{E_{ST} \cdot V_A \cdot G_D}$$

E_A = Extinktion der Analyse

V_A = DC-Auftragung der Analyse in µl

E_{ST} = Extinktion des Standards

V_{ST} = DC-Auftragung des Standards in µl

G_{ST} = Einwaage des Standards in mg/5 ml gelöst

G_D = Einwaage der Droge, des Extraktes oder der zu untersuchenden Probe in mg/5 ml gelöst

2. Gaschromatographische Bestimmung

Standardsubstanz: Palmitinsäuremethylester (Fa. Merck, Darmstadt)

a) Bestimmung des Korrekturfaktors

Genau gewogene Mengen Isopetasin und Palmitinsäuremethylester in einer Konzentration von 5 mg/5 ml Methanol werden im Gaschromatographen mehrere Male in unterschiedlichen Konzentrationen (1.1. μ l, 1.9 μ l und 2.5 μ l) analysiert. Aus den Flächen errechnet sich der Korrekturfaktor nach:

$$\text{Korrekturfaktor } f = \frac{\text{Menge Standard} \cdot \text{Fläche Isopetasin}}{\text{Menge Isopetasin} \cdot \text{Fläche Standard}}$$

Da für die Bestimmung des Korrekturfaktors nur Isopetasin in der nötigen Reinheit zur Verfügung stand (Reinheit GC: 92.4%), wurde der Korrekturfaktor für Petasin, das im Gaschromatographen getrennt von Isopetasin bestimmt wird, dem Faktor für Isopetasin gleichgesetzt.

b) Herstellung der Analysenlösung

10.0 g luftgetrocknete, genau gewogene Droge, wurde zerkleinert, Sieb 4, DAB 7 BRD (bzw. eine entsprechende Anzahl Tabletten, Dragees u.ä.) werden wie auf Seite 112, 1.a) beschrieben mit Petroläther extrahiert, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und mit ca. 10 mg genau gewogener Standardsubstanz (Palmitinsäuremethylester) versetzt. Diese Mischung wird in 1 ml Methanol p.a. gelöst. Ca. 30 mg genau gewogener Extrakt und ca. 10 mg genau gewogene Standardsubstanz werden in 1 ml Methanol p.a. gelöst.

c) Gaschromatographische Bedingungen

Siehe allgemeine Arbeitsbedingungen Seite 95.

Integrator: Perkin-Elmer D 26 mit Kienzle Drucker D 21

Integritorempfindlichkeit: 0.5 uV/sek.

Einspritzmengen: ca. 3 - 4 μ l des oben angegebenen
Extraktes bei einer Detektorabschwächung
von 5120

Korrekturfaktor Petasin-Isopetasin (FID) 0.711

Retentionszeiten und relative Retentionszeiten:

	Ret. Zeit (ca. Min.)	Rel. Ret. Zeit
Palmitinsäuremethylester	18.6	1.0
Albopetasin	21.4	1.15
Furanopetasin	24.4	1.31
Petasin	25.2	1.35
Isopetasin	26.0	1.40

Berechnungsformel:

$$\% \text{ Petasin bzw. Isopetasin} = \frac{F_{P/IP} \cdot M_{ST} \cdot 100}{F_{ST} \cdot f \cdot M_{D/E}}$$

$F_{P/IP}$ = Fläche Petasin bzw. Isopetasin

M_{ST} = Menge an zugesetztem Standard

F_{ST} = Fläche des zugesetzten Standards

f = Korrekturfaktor

$M_{D/E}$ = Menge an Droge bzw. Extrakt

3. Untersuchung der "S-Petasine"

Der auf dem DC für die "Petasine" markierte fluoreszenz-mindernde Fleck (s.S. 112) wurde mit Methanol vom Kieselgel eluiert und in dem erhaltenen Substanzrückstand Schwefel nachgewiesen.

Schwefelnachweis

(Vergleichssubstanz: Thioharnstoff)

1. Direkter Schwefelnachweis aus der Substanz

Der Rückstand wurde mit 1.0 ml 30% H_2O_2 und 2 Tropfen 10% Eisen(III)-chloridlösung versetzt. Nach heftiger Reaktion-Wasserkühlung-wurde mit 30 ml H_2O verdünnt und mit 1.0 ml 3n HCl sowie 1 ml 5% Bariumchloridlösung versetzt. Es entstand ein weißer Bariumsulfatniederschlag.

2. Aufschluß nach Lassaigne

Der Rückstand wurde mit einem erbsengroßen Stück blankem Natrium in ein Glühröhrchen gebracht. Das Röhrchen wurde, mit der Sparflamme beginnend, langsam von oben nach unten erhitzt. Als das Natrium geschmolzen war, wurde noch einige Minuten stark durchgeglüht und das Röhrchen in Rotglut in ein Reagenzglas mit 6 ml Wasser fallen gelassen, filtriert und der Rückstand mit wenig heißem Wasser ausgezogen.

Das Filtrat wurde mit einigen Tropfen einer frisch bereiteten 2.5%igen Lösung von Dinatriumpentacyanonitrosylferrat(II) versetzt. Es entstand eine schwach violette Färbung.

G. STABILITÄTSVERSUCHE

Die Wärmeversuche der äthanolischen Extrakte und Frischpflanzenpreßsäfte wurden in einem Trockenschrank bei 40°C durchgeführt. Das frische Pflanzenmaterial wurde ebenfalls in einem Trockenschrank bei den verschiedenen Temperaturen getrocknet. Die Gefriertrocknung erfolgte in einer Anlage der Fa. Leybold, Köln.

Der Einfluß von Luft und Licht wurde durch Lagerung der Extrakte und Frischpflanzenpreßsäfte unter oben genannten Bedingungen festgestellt. Über den gleichen Zeitraum hinweg wurde ein äthanolischer Extrakt bzw. ein Spissumextrakt in einer Glasampulle unter Stickstoffatmosphäre eingeschmolzen. Bei den Versuchen mit Sorbinsäure wurden jeweils 100 ml Olea-Extrakt äthanol. mit 0.05%, 0.1% und 0.5% Sorbinsäure (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt und bis zur Lösung geschüttelt. Die Untersuchung erfolgte nach 32 Tagen.

Daneben versetzten wir 100 ml Artischocken-Frischpflanzenpreßsäfte mit ca. 1 g Acidum Citricum (Fa. Merck, Darmstadt) bis zu einem pH von 3 und gaben zu 100 ml 50 g NaCl.

Bei den Versuchen zum Säure-Base-Abbau verwendeten wir Äthanollextrakte der Handelsdroge und eine Lösung von reinem Oleuropein in Methanol. Jeweils 1 ml Untersuchungsprobe wurde mit 3 ml Methanol und 0.7 ml Pufferlösung versetzt und über 3 Stdn. in einem Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Die Untersuchungen erfolgten mittels DC (siehe Seite 95).

Als Pufferlösungen wurden verwendet:

- a) Na-Citrat/HCl (0.1 mol Na-Citrat + 0.1 n HCl)
- b) Glycin/NaOH (0.1 mol Glycin + 0.1 n NaOH)

Die Pufferlösungen wurden auf folgende pH-Werte eingestellt:

1.1 - 2.4 - 7.0 - 9.1 - 10.1 - 11.6

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ROCHIETTA S., Minverva farm.Ital. 8, 71 (1959)
- 2) MAYR A. und FRÖHLICH E., Österr.Apoth.-Ztg. 19, 468 (1965)
- 3) CHOMEL P.H.B. (1761), zit. von ROCHIETTA 1)
- 4) GUITTEAU P., zit. von TIXIER L., Rev.Med.Franc.16, 401 (1935)
- 5) BREL J., Bull.Soc.Therap. (1929) und L'Artichaut, Amedee Legrand. Ed., Paris (1930)
- 6) CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M. und WAITZ R., C.R.Soc.Biol. 108, 1020 (1931)
- 7) SCHINDEL L., Arch.exper.Path.Pharmakol. 175, 313 (1934)
- 8) BÖHM K., Arzneimittel-Forsch. 9, 376 (1959)
- 9) a. PANIZZI L. und SCARPATI M.L., Gazz.Chim.Ital. 84, 792 (1954) und Nature 174, 1062 (1954)
b. PANIZZI L., SCARPATI M.L. und SCARPATI R., Gazz.Chim.Ital. 84, 812 (1954)
- 10) OKAMOTA M., Mitt.med.Akad.Kyoto 28, 1041 (1940); ref.C.A. 35, 3323 (1941)
- 11) TREMOLIERE F., THIERY J.E. und FAUCHET H., Bull.gen.ther. (Paris) 184, 193 (1933); Quart.J.Pharm.Pharmacol. 6, 726 (1933)
- 12) STRUPPLER A. und RÖSSLER H., Med.Monatsschr. 11, 221 (1957)
- 13) BERTOLANI F., DARDARI M. und MASSA L., La Radiol.Med. 45, 8 (1958)
- 14) HAMMERL H. und PICHLER O., Wiener med.Wschr. 109, 853 (1959)
- 15) SCHREIBER J., ERB W., WILDGRUBE J. und BÖHLE E., Z.Gastroenterologie 8, 230 (1970)
- 16) TIXIER L., ECK M. und DESBORDES J., Bull.Soc.Chim.Biol. 17, 893 (1935)
- 17) PREZIOSI P. und LOSCALZO B., Fitoterapia 27, 666 (1956); Arch.ital.sci.farmacol. 7, 249 (1957)
- 18) GAUDIN O., Bull.Sci.Pharmacol. 46, 167 (1939)
- 19) OUDOT P., Sem.Hop. (Paris) 48 (1947)
- 20) MAROS T., RACZ G., KATONAI B. und KOVACS V., Arzneimittel-Forsch. 16, 127 (1966) ibid. 18, 844 (1968)
- 21) ECK M. und DESBORDES J., C.R.Soc.Biol. 117, 428, 615 (1935) ibid. 118, 498 (1935)
- 22) TIXIER L. und GODREAU F., Presse Med. 47, 880 (1939)
- 23) DEL VECCHIO A., Boll.Soc.ital.Biol.sper. 29, 48 (1953)
- 24) FRÖHLICH E. und MAYR A., Österr.Apoth.-Ztg. 27, 813 (1973)
- 25) MORELLET J., Journ.de med. 1930, zit. von CHABROL 6)
- 26) BALANSARD J., Bull.Soc.Pharm.Marseille 2, 28 (1952)
- 27) a. MORTIER F., These Doct.Pharm.Etat Nancy (1972)
b. BOGAERT J.P., These Doct.Pharm.Etat Paris (1973)
- 28) EDGARD-ROSA G., Progres med. 48, 256 (1934); Gazz.Hop. 107, 21 (1934); zit. von BENIGNI R., CAPRA C. und CATTORINI P.E., Piante medicinali, Bd. I, Inverni u. Della Beffa-Verlag, Milano, 1971, p. 235
- 29) RAVINA A., Presse Med., 42, 1299 (1934)
- 30) TIXIER L., DE SEZE S. und ECK M., Rev.Med. 54, 204 (1937)
- 31) TIXIER L. und DE SEZE S., Presse Med. 47, 880 (1939)
- 32) PANIZZI L. und SCARPATI M.L., Gazz.Chim.Ital. 95, 71 (1965)

- 33) SCARPATI M.L., ORIENTE G. und PANIZZI L., Ann.chim.(Rom) 47, 150 (1957)
- 34) SCARPATI M.L. und ESPOSITO P., Tetrahedron Letters 1147 (1963)
- 35) DRANIK L.I., Fenol'nye Soedin. Ikh Biol.Funkts., Mater.Vses. Simp., 1st 53 (1966); ref. C.A. 71, 19515 (1969)
- 36) NICHIFORESCU E., Plant.Med.Phytother. 4, 56 (1970)
- 37) MICHAUD J., Bull.Soc.Pharm.Bordeaux 106, 181 (1967)
- 38) SCARPATI M.L. und GUIZO M., Ann.chim.(Rom) 53, 1315 (1963)
- 39) NICHIFORESCU E., Farmacia 18, 247 (1970)
- 40) MASQUELIER J. und MICHAUD J., Bull.Soc.Pharm.Bordeaux 95, 65 (1956)
- 41) MICHAUD J. und MASQUELIER J., Bull.Soc.Pharm.Bordeaux 96, 103 (1957)
- 42) MICHAUD J. und MASQUELIER J., Bull.Soc.Pharm.Bordeaux 97, 77 (1958)
- 43) DRANIK L.I., CHERNOBAI V.T. und KOLESNIKOV D.G., Med.Prom. SSSR 18 23 (1964)
- 44) DRANIK L.I. und CHERNOBAI V.T., Khim.Prir.Soedin. 2, 16 (1966); ref. C.A. 65, 3947 (1966)
- 45) SUCHY M., HEROUT V. und SORM F., Collect.Czech.Chem.Communit. 25, 507 (1960) *ibid.* 2777 (1960)
- 46) SAMEK Z., HOLLUB M., DROZDZ B., IOMMI G., CORBELLA A. und GARIBOLDI P., Tetrahedron Letters 4775 (1971)
- 47) GONZALES A.G., MARRERO B.G. und BRETON J.L., Terpenoides de las compuestas 799 (1970)
- 48) DROZDZ B., Diss.Pharm.Pharmacol. 20, 217 (1968)
- 49) ATHERINOS A.E., J.Chem.Soc. 1700 (1962)
- 50) BERNARD P. und LALLEMAND A., Bull.Soc.Pharm.Marseille 1, 15 (1953)
- 51) SAMOCHOWIEC L., Farmacia Polska 17, 257 (1961)
- 52) CALZOLARI C. und DONDA A.D.
a. Ann.chim. (Rom) 47, 1256 (1957)
b. Ann.chim. (Rom) 48, 1253 (1958)
- 53) GHIELMETTI G.H. und BACCHINI M., Farmaco 14, 284 (1959)
- 54) DRANIK L.I., Farmatsevt Zh. 20, 56 (1965)
- 55) COLOMBO E., Farmaco 23, 43 (1968)
- 56) SCHILCHER H., Sci.Pharm. 39, 151 (1971)
- 57) FRÖHLICH E., Subsidia Med. 25, 1 (1973)
- 58) ARNOW E., J.Biol.Chem. 118, 531 (1937)
- 59) LONGO E., Boll.Chim.Farm. 101, 41 (1962)
- 60) MICHAUD J., These Doct.Pharm.Etat Bordeaux (1964)
- 61) NICHIFORESCU E. und CUCU V., Ann.Pharm.Franc. 23, 419 (1965)
- 62) RODRIGUEZ H.B., Rev.Farm. (Buenos Aires) 108, 199 (1966)
- 63) SCEMAMA M. und GARDE PH., Plant.Med.Phytother. 5, 39 (1971)
- 64) MICHAUD J., Ann.Pharm.Franc. 24, 533 (1966)
- 65) CONSTANTINESCU D.G., PLATON F. und APREOTESEI C., Farmacia 9, 333 (1961)
- 66) CONSTANTINESCU D.G., PLATON F. und PAVEL M., Pharmazie 22, 176 (1967)
- 67) SCHNEIDER G. und THIELE K., Planta Med. 25, 149 (1974)
- 68) DIESEL P., Dissertation München (1974)

- 69) PARIS R. und HERISSET A., *Plant.Med.Phytother.* 3, 44 (1969)
- 70) NICHIFORESCU E. und CUCU V., *Mitt.Soc.de Stiinte Naturale si Geografie din R.P.R., Sectia Botanica*, Mai 1965
- 71) NICHIFORESCU E., *Ann.Pharm.Franc.* 25, 285 (1967)
- 72) NICHIFORESCU E., WINTER D., SAUVARD S. und STANESCU C., *Farmacia* 16, 113 (1968)
- 73) NETIEN G. und ROULIER A., *Bull.Trav.Soc.Pharm.Lyon* 11, 99 (1967)
- 74) ENGLER A., *Syllabus der Pflanzenfamilien Bd. II, Gebr.Born-träger*, Berlin-Nikolasee, 1964
- 75) HEGI G., *Flora von Mitteleuropa Bd. V/3*, Carl Hanser-Verlag, München, 1966, p. 1934
- 76) SPRECHER VON BERNEGG A., *Tropische und subtropische Weltwirt-schaftspflanzen Bd. II*, Emke-Verlag, Stuttgart, 1929, p. 1
- 77) MAZET G., *Gaz.Med.France* (1938), zit. nach LECLERC 78)
- 78) LECLERC H., *Rev.Phytother.* 8, 3 (1944)
- 79) DE NUNNO R. und CAPRETTI G., *Prod.Pharm.* 333 (1951)
- 80) BRUNET A.D. und OLIVIERO M., *Bull.Acad.Med.* 122, 191 (1931)
- 81) JARDON P., *These Doct.Pharm.Univ.Lyon* (1942)
- 82) CAPRETTI G., *Giorn.clin.med.* 29, 394/491 (1948)
- 83) BALANSARD J. und DELPHAUT J., *Rev.Phytother.* 17, 19/35 (1953)
- 84) SAMUELSSON A.G., *Farm.Revy* 50, 229 (1951); *Collect.Pharm.Suec.* 6, (1951); *ref. Dtsch.Apoth.-Ztg.* 92, 294 (1952)
- 85) a. KOSAK R. und STERN P., *Bull.Sci.* 2, 46 (1956)
Acta Pharm.Jugosl. 6, 121 (1956)
b. KOSAK R. und STERN P., *Planta Med.* 7, 118 (1959)
- 86) JANKU J., RASKOVA H. MOTL O. und BLAZEKEZ Z., *Arch.int. Pharmacod.* 112, 342 (1957)
- 87) PETKOV V. und MANOLOV P., *Arzneimittel-Forsch.* 9, 22 (1972)
- 88) LANDERER H., *Rep.Pharm.* 7, 205 (1836)
- 89) LANDERER H., *Rep.Pharm.* 22, 348 (1840)
- 90) VINTILESCO J., *These Sc.nat.Paris* (1910)
- 91) BOUQUELOT E. und VINTILESCO J., *C.R.* 147, 533 (1908); *J.Pharm. Chim.* 28, 303 (1908); *ibid.* 1, 292 (1910)
- 92) GRUESS W.V. und ALSBERG C.L., *J.Am.Chem.Soc.* 56, 2115 (1959)
- 93) SASHA B. und LEIBOWITZ J., *Bull.Research Council Israel* A.8, 92 (1959); *Nature* 184, 2019 (1959)
- 94) a. PANIZZI L., SCARPATI M.L. und ORIENTE G., *Ricerca Sci.* 28, 994 (1958)
b. PANIZZI L., SCARPATI M.L. und ORIENTE G., *Gazz.Chim.Ital.* 90, 1449 (1960)
c. PANIZZI L., SCARPATI M.L. und TROGOLO C., *Gazz.Chim.Ital.* 95, 1279 (1965)
- 95) INOUE H., YOSHIDA T., TOBITA S., TANAKA K. und NISHIOKA T., *Tetrahedron Letters* 2459 (1970)
- 96) VEER W.L.C., GERRIS V. und RIBBERS J.E., *Rec.Trav.Chim.Pays-Bas* 76, 839 (1957)
- 97) BEYERMAN H.C., VAN DIJCK L.A., LEVISALLES J., MELERA A. und VEER W.L.C., *Bull.Soc.Chim.France* 1812 (1961)
- 98) MECHOULAM R., DANIELI N. und MAZUR Y., *Tetrahedron Letters* 709 (1962)
- 99) SCARPATI M.L. und TROGOLO C., *Tetrahedron Letters* 5673 (1966)

- 100) BOCKOVA H., HOLUBEK J. und CEHAN Z., Collect.Czech.Chem. Commun. 29, 1484 (1964)
- 101) HÄNSEL R., BARTHEL L. und RIMPLER H., Arch.Pharm. 303, 860 (1970)
- 102) POWER F.B. und TUTIN F., Trans.Chem.Soc. 93, 891 (1908), *ibid.* 93, 904 (1908)
- 103) VAN DER HAAR A.W., Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 43, 546 (1924)
- 104) HUNECK S., Naturwiss. 48, 73 (1961)
- 105) HUNECK S. und LEHN J.M., Bull.Soc.Chim.France 321 (1963)
- 106) BRUNET A.D. und OLIVIERO M., Bull.Acad.Med. 122, 191 (1939)
- 107) SCHNEIDER G. und KLEINERT W., Naturwiss. 58, 534 (1971)
- 108) COHEN S., LIFSHITZ A. und SAMISCH Z., J.Ass.Offic.Anal.Chem. 50, 1194 (1967)
- 109) COHEN S. und LIFSHITZ A., J.Ass.Offic.Anal.Chem. 52, 310 (1969)
- 110) HEGNAUER R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. V, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart, 1969, p. 234 (1888)
- 111) SCHLADGENHAUFFEN und REEB, J.Pharmacie d'Alsace-Lorraine 237
- 112) GILLOT P. und LEGRAS E., Bull.Sci.Pharmacol. 34, 205 (1927)
- 113) ZELLNER J., Arch.Pharm. 272, 601 (1934)
- 114) BUCHER K., Arch.exper.Path.Pharmakol. 213, 69 (1951)
- 115) AEBI A., BÜCHI J., WAALER T., EICHENBERGER E. und SMITZ J., Pharm.Acta Helv. 30, 277 (1955)
- 116) AEBI A., WAALER T. und BÜCHI J., Pharm.Weekbl. 93, 397 (1958)
- 117) AEBI A. und WAALER T., Über die Inhaltsstoffe von Petasites hybridus (L.) Fl.Wett., Haelbing und Lichtenhahn-Verlag, Basel, 1959
- 118) STOLL A., RENZ J. und MORF R., Referentenband XIV, Internationaler Kongreß für reine und angewandte Chemie, Zürich, 1955, p. 203
- 119) STOLL A., MORF R., RHEINER A. und RENZ J., Experientia 12, 360 (1956)
- 120) CREMA A., MILANI C. und ROVATI L., Farmaco 12, 726 (1957)
- 121) HÖRHAMMER L. und WAGNER H., zit. von KARL 122)
- 122) KARL J., Naturheilpraxis 24, 290 (1971)
- 123) SCHMEIL O. und FITSCHEN J., Flora von Deutschland, Verlag Quelle und Meyer, Heidelberg, 1960, p. 391
- 124) HESS H.E., LANDOLT E. und HIRZEL R., Flora der Schweiz, Bd.III Birkhäuser-Verlag, Basel, 1972, p. 468
- 125) LAY B., Dissertation München (1965)
- 126) NOVOTNY L., HEROUT V. und SORM F., Tetrahedron Letters 697(1966) NOVOTNY L., JIZBA J., HEROUT V. und SORM F., Collect.Czech. Chem. Commun. 27, 1393 (1962), *ibid.* 27, 2462 (1962)
- 127) HEROUT V., HOCHMANNOVA J. und SORM F., Angew.Chemie 76, 789 (1964)
- 128) HOCHMANNOVA J. und HEROUT V., Collect.Czech.Chem.Comm. 29, 2369 (1964)
- 129) NOVOTNY L., SAMEK Z. und SORM F., Collect.Czech.Chem.Comm. 31, 371 (1966)
- 130) NOVOTNY L., TOMAN J., STARY F., MARQUEZ A.D., HEROUT V. und SORM F., Phytochemistry 5, 1281 (1966)
- 131) NOVOTNY L., SAMEK Z., HARMATHA J. und SORM F., Collect.Czech. Chem.Comm. 34, 336 (1969)

- 132) KREPINSKY J., MOTL O., DOLEJS L., NOVOTNY L., HEROUT V. und BATES R.B., Tetrahedron Letters 3315 (1968)
- 133) NOVOTNY L., TABACIKOVA-WLOTZKA CH., HEROUT V. und SORM F., Collect.Czech.Chem.Comm. 29, 1922 (1964)
- 134) NOVOTNY L., JIZBA J., HEROUT V., SORM F., ZALKOW L.H., HU S. und DJERASSI C., Tetrahedron 19, 1101 (1963)
- 135) HOCHMANNOVA J., NOVOTNY L. und HEROUT V., Collect.Czech.Chem. Commun. 27, 1870 (1962) *ibid.* 27, 2711 (1962)
- 136) NOVOTNY L., HEROUT V. und SORM F., Collect. Czech.Chem.Comm. 27, 1400 (1962)
- 137) NOVOTNY L. und HEROUT V. Collect.Czech.Chem.Comm. 27, 2462 (1962)
- 138) VOKAC K., SAMEK Z., HEROUT V. und SORM F., Tetrahedron Letters 1665 (1972)
- 139) SCHWENDIMANN J.M., TABACCHI R. und JACOT-GUILLARMOD A., *Helv. Chim.Acta* 57, 552 (1974)
- 140) EFIMOVA F.V. und MURAV'EVA D.A., *Aptechn.Delo* 14, 41 (1965); *ref. C.A.* 64, 3955 (1969)
- 141) NOVOTNY L., SAMEK Z. IOMAN J., HEROUT V. und SORM F., JUPAC, 5.Int.Symp.Chem.Nat.Prod.London 1968
- 142) NOVOTNY L., SAMEK Z., HEROUT V. und SORM F., Tetrahedron Letters 1401 (1968)
- 143) HÖRHAMMER L., WAGNER H. und LAY B., *Dtsch.Apoth.-Ztg.* 103, 429 (1965)
- 144) FRANZ G., *Planta Med.* 14, 90 (1966)
- 145) FRANZ G., *Planta Med.* 17, 217 (1969)
- 146) WAGNER H. und GLASL H., *Phytochemisches Praktikum, München*, 1974, p. 124



LEBENS L A U F

25. April 1944 Gertrud, Marianne, Elisabeth Huber,
geb. in Pfarrkirchen/Niederbayern
Eltern: Dr.med.dent.Joseph Huber und
Marianne Huber geb.Ebner
- 1950 - 1963 Schulausbildung in Pfarrkirchen an der
Volks- und Oberrealschule
17. Juli 1963 Reifeprüfung
2. Sept. 1963 - Apothekerpraktikum in der Stadt-Apotheke
12. August 1965 in Pfarrkirchen, Inh. Hans Moser
- September 1965 Pharmazeutisches Vorexamen in Landshut
- 1966 - 1969 Studium der Pharmazie an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
1. November 1969 - Verwalter einer wissenschaftlichen
31. Oktober 1974 Assistentenstelle am Institut für
Pharmazeutische Arzneimittellehre
der Universität München für den bota-
nischen Unterricht an der Tierärztlichen
Fakultät
- Januar 1971 Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut
für Pharmazeutische Arzneimittellehre der
Universität München
Anleitung Professor Dr.H.Wagner
- Juli 1974 Verleihung eines Auslandsfortbildungs-
stipendiums durch den DAAD und die fran-
zösische Regierung für ein "Certificat
d'Etudes specialises" in Bakteriologie
und klinischer Virologie an der Univer-
sität Grenoble für das Universitätsjahr
1974/75.
- Jan.75 - Sept.1975 Forschungsarbeiten mit Professor Mme
J.Debelmas im Laboratoire de Pharmacog-
nosie, U.E.R. des Sciences Pharmaceuti-
ques et Biologiques der Universität
Grenoble.



DRUCK :

Accord Blitz

Offset-Schnelldruck · 8 München 2 · Lindwurmstr. 60 Ghs. · Tel. 77 5218

